

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK INNENSTADT

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. med. W. Mutschler

**ANALYSE INTRAZELLULÄREER mRNA-EXPRESSION  
IN MONOZYTEN UND PMN-GRANULOZYTEN  
POLYTRAUMATISIERTER PATIENTEN MITTELS  
REAL-TIME PCR**

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

Vorgelegt von  
Verena Petra Mayer  
aus  
Stuttgart  
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Fritz Krombach  
Prof. Dr. Josef Briegel  
Prof. Dr. Helmut Ostermann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Peter Biberthaler

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2008

FÜR MEINE LIEBEN ELTERN

## **INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>1. <u>Einleitung</u></b>	
1.1 Allgemeines	- 6-
1.2 Immunmodulation nach Polytrauma	- 8-
1.3 Unspezifisches und spezifisches Immunsystem	-10-
1.4 Humorale Mediatoren	-11-
1.5 Zelluläre Mechanismen	-12-
<b>2. <u>Fragestellung</u></b>	-16-
<b>3. <u>Patienten und Methoden</u></b>	
3.1 Studienkollektive	-17-
3.1.1 Kontrollkollektiv	-18-
3.1.2 Patientenkollektiv	-18-
3.2 Probengewinnung und Zellisolation	-21-
3.3 Real-Time PCR	-24-
3.4 Flankierende Kontrolluntersuchungen	-28-
3.5 Statistik	-29-
<b>4. <u>Ergebnisse</u></b>	
4.1 Demographische und klinische Daten der Studienkollektive	-30-
4.2 Probengewinnung und Zellisolation	-30-
4.3 Real-Time PCR	-32-
4.3.1 Kontrollkollektiv	-33-
4.3.2 Patientenkollektiv	-43-
4.4 Flankierende Kontrolluntersuchungen	-57-
<b>5. <u>Diskussion</u></b>	
5.1 Allgemeines	-59-
5.2 Demographische und klinische Daten	-59-
5.3 Probengewinnung und Zellisolation	-61-
5.4 Real-Time PCR	-62-
5.4.1 Kontrollkollektiv	-63-
5.4.2 Patientenkollektiv	-64-
<b>6. <u>Zusammenfassung</u></b>	-70-
<b>7. <u>Literaturverzeichnis</u></b>	-73-
<b>8. <u>Verwendete Abkürzungen</u></b>	-81-
<b>9. <u>Materialien</u></b>	
9.1 Geräte und Material	-82-
9.2. Chemikalien	-83-

**10. Danksagung**

-84-

**11. Lebenslauf**

-85-

## **1. EINLEITUNG:**

### 1.1 Allgemeines

In den westlichen Industrienationen ist der Tod durch Unfall für die unter 30-Jährigen die häufigste Todesursache und nimmt bei der Gesamtmortalität in der westlichen Bevölkerung den 4. Rang ein (Trunkey et al., 1993). Allein in Deutschland verstarben 1999 von insgesamt 52 127 Schwerverletzten 7772 Menschen an den Unfallfolgen (Statistisches Bundesamt 2000). Definitionsgemäß nach *Tscherne* und *Trentz* versteht man unter dem Begriff „Polytrauma“ die gleichzeitig entstandene Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, wobei wenigstens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich ist (Tscherne & Trentz, 1986). Die Mortalität nach Trauma wurde von *Sauaia* in Abhängigkeit der Verletzungsart und –schwere in 3 unterschiedliche Zeitabschnitte untergliedert (Sauaia et al., 1995). Circa ein Drittel der verstorbenen Unfallopfer verstirbt innerhalb der ersten 60 Minuten aufgrund der Verletzungsschwere, die mit dem Leben nicht vereinbar ist. Um die Mortalität dieser Gruppe zu reduzieren, sind umfangreiche präventive Strategien zur Unfallverhütung von Bedeutung. Das zweite Drittel verstirbt innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Unfall, meist am Schädel-Hirn-Trauma oder den nicht stillbaren Massenblutungen nach Verletzung großer Gefäße oder stark durchbluteter parenchymatöser Organe. Eine rasche präklinische Rettungsabfolge hat hier oberste Priorität. Zentrales Ziel ist eine schnelle Rettung und eine chirurgische Versorgung der Verletzungen. Die dritte Gruppe verstirbt erst 24 Stunden nach Trauma oder später. Als Todesursache steht hier das posttraumatische Organversagen im Vordergrund. Auch neuere Studien konnten zeigen, dass das Multiorganversagen nahezu ein Drittel aller späten Todesfälle bedingt (Ciesla et al., 2005; Goris et al., 1982; Sauaia et al., 1995). Für die Ausbildung und Ausprägung der posttraumatischen Folgereaktionen wird dabei

dem Immunsystem eine entscheidende Rolle zugesprochen [Übersichtsarbeit siehe: Keel & Trentz, 2005]. Die lokale Aktivierung des Immunsystems dient physiologischerweise zur Reparatur der primären Verletzung, als auch zur Begrenzung des Schadens für den gesamten Organismus. Es wird hier dem unspezifischen Immunsystem, wie beispielsweise den Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, eine tragende Rolle zugeschrieben. Die von ihnen freigesetzten Zytokine, Proteasen, Sauerstoffradikale und Wachstumsfaktoren liefern damit die notwendigen Voraussetzungen für die Heilung des zerstörten Gewebes. Von großer Bedeutung sind hier die kapillare Dilatation, die Steuerung weiterer Zellinfiltrationen für Abräumreaktionen, die Angiogenese und die Bildung von Reparaturgewebe. Im Gegensatz dazu werden systemische Entzündungsreaktionen polytraumatisierter Patienten als eine Art Überreaktion des Organismus gedeutet. Diese Überreaktion kann die immunologische Aktivierung lokaler Reparaturmechanismen über deren Grenzen hinweg auch in andere, zunächst nicht involvierte Gewebeareale oder Organe tragen. Diese generalisierte Entzündungsreaktion wird als *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)* beschrieben (Davies & Hagen, 1997; Bone, 1996; Pittet et al., 1995; Bone et al., 1992) und eindeutig mit der Ausbildung und Ausprägung posttraumatischer Organfunktionsstörungen (*multiple organ dysfunction syndrome = MODS, multiple organ failure = MOF*) in Zusammenhang gebracht (Oberholzer et al., 2005; Baue et al., 1998; Faist et al., 1996; Huang et al., 1998; Cavaillon et al., 2001; Ertel et al., 1998; Angele & Faist, 2002).

Obwohl durch die moderne Intensivbetreuung des Patienten die Sterblichkeit reduziert werden konnte (Stahel et al., 2005; Nast-Kolb et al., 2001), sind die negativen Konsequenzen durch Bluttransfusion, Langzeitbeatmung, lange Liegezeiten, langes künstliches Koma, etc., dennoch unverändert hoch (Ciesla et al., 2005). Das Ziel der

wissenschaftlichen Forschungen ist daher, die Mortalität durch systemisch ausgelöste Organfunktionsstörungen in Folge von Traumata zu minimieren.

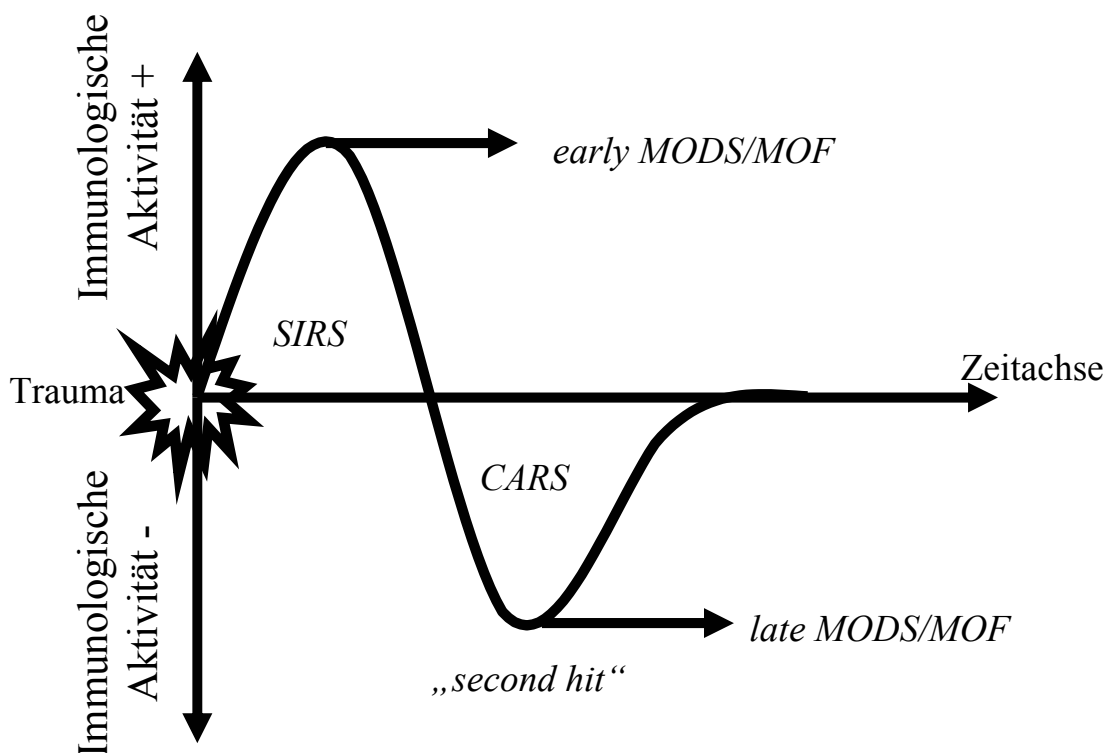
Nach heutigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass ein Interagieren von Zellen des unspezifischen Immunsystems (Botha et al., 1995b; Botha et al., 1995a), das Komplementsystem und das spezifische Immunsystem mit humoraler und zellulärer Immunantwort verantwortlich für die Entwicklung einer posttraumatischen Fehlregulation sind (Laudanski et al., 2006). Als Auslöser wird hierbei der alleinige Zellschaden gesehen, der zerstörte Gewebestrukturen mit immunkompetenten Zellen in Verbindung bringt. Durch Ischämie und Reperfusion werden auch humorale Komponenten wie das Komplementsystem und das Gerinnungssystem aktiviert. Zelluläre Komponenten, wie die *Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)*, tragen ebenso zur Entwicklung des *SIRS* bei (Mannick et al., 2001). Die zugrunde liegenden traumasensitiven Steuerungsmechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Die Kenntnis dieser Schlüsselmechanismen, als auch der daran beteiligten Proteine, die für die Initiierung einer systemischen Reaktion maßgeblich verantwortlich sind und den weiteren Verlauf charakterisieren, ist von großem Interesse, um zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach Trauma therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können, die eine systemische Entzündungsreaktion und damit ein folgendes Multiorganversagen verhindern bzw. mildern können.

### 1.2 Immunmodulation nach Polytrauma:

Studien der letzten 20 Jahre ließen folgende Theorie über die Entwicklung des *SIRS* entstehen, die von *Mannick et al.* zusammenfassend dargestellt wurde (Mannick et al., 2001; Moore et al., 2005): Verletzte Patienten können direkt nach der initialen Stabilisierungsphase ein *SIRS* entwickeln. Ein frühes Multiorganversagen wird zu diesem Zeitpunkt als „*early MOF*“ bezeichnet. Überlebt der Patient diese Phase, kann



sich eine kompensatorische Immundysfunktion, das *compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS)* entwickeln. Die Abwehr ist zu diesem Zeitpunkt gegen vorhandene physiologische und pathogene Keime stark geschwächt. Kommt es jetzt zur Infektion mit systemischer Entzündungsreaktion, können Organdysfunktion und Organversagen, initial unverletzter Organe Folge sein (z.B. *ARDS*, Leberversagen, etc.). Dies wird dann als spätes Multiorganversagen (*late MOF*) beschrieben [Übersichtsartikel siehe: Hildebrand et al., 2005a].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Entwicklung eines posttraumatischen Organversagens. Diese Graphik modifiziert nach Moore et al. (Moore et al., 1996) gibt die derzeit aktuelle Vorstellung von der Dynamik und Ausprägung posttraumatischer Entzündungsreaktionen (*SIRS*) und deren Zusammenhang mit der Ausbildung von Organfunktionsstörungen (*multiple organ dysfunction syndrome=MODS*) bis hin zum Multiorganversagen (*multiple organ failure=MOF*) wieder. Fällt die Ausbildung einer Organfunktionsstörung oder eines Organversagens in die frühe posttraumatische hyperinflammatorische Phase, spricht man von einem frühen, fällt sie in die antiinflammatorische Phase (*compensatory antiinflammatory response syndrome = CARS*) spricht man von einem späten *MODS* bzw. *MOF*.

In diesem Zusammenhang wurde bereits Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts erkannt, dass die zu frühe Exposition eines polytraumatisierten Patienten gegenüber einem weiteren starken Stress (z.B. einer aufwendigen Operation) zu einer zusätzlichen Freisetzung von immunologisch hochaktiven Mediatoren führt. Das Risiko für eine überschießende Entzündungsreaktion mit Organfunktionseinschränkung und Organversagen wird potenziert. Diese klinische Entität wurde als „*second hit*“-Phänomen beschrieben (Miyaoaka et al., 2005; Botha et al., 1995b; Botha et al., 1995a; Pape et al., 2001). Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind bislang nicht eindeutig identifiziert. Hinweise, dass zunächst eine Aktivierung des unspezifischen und dann des spezifischen Immunsystems erfolgt, liegen vor (Faist et al., 1996). Bisherige Erkenntnisse sollen im Folgenden dargestellt werden.

### 1.3 Unspezifisches und spezifisches Immunsystem:

1) Unspezifisches Immunsystem: Zu dem unspezifischen Immunsystem, welches entwicklungsgeschichtlich dem spezifischen vorausgeht, werden physiologische Barrieren, wie Haut und Schleimhäute, immunkompetente Zellen wie Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und das Komplementsystem gezählt.

2) Spezifisches Immunsystem: Zum spezifischen Immunsystem gehören auf humoraler Ebene die spezifischen Antikörper und auf zellulärer Ebene differenzierte T- und B-Lymphozyten.

Autoren vorausgegangener Studien diskutierten, dass das *SIRS* der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems (Kelly et al., 1997; van der Poll et al., 1995) und das *CARS* der Aktivierung des spezifischen Immunsystems (Pellegrini et al., 2000; Faist et

al., 1986; Mack et al., 1996) entspricht. In Folgestudien wurde jedoch der Verdacht geäußert, dass das unspezifische und das spezifische Immunsystem eng miteinander verzahnt sind und sowohl Einfluss auf die Entwicklung eines *SIRS* als auch auf ein *CARS* haben könnten (Keel & Trentz, 2005; Bone, 1996; Kell et al., 1999; Curtsinger et al., 1999). Ebenso gibt es Hinweise, dass beide Phänomene zeitgleich an verschiedenen Lokalisationen auftreten können. So wird eine inflammatorische Antwort überwiegend verletzungsnah gefunden, während eine antiinflammatorische Antwort insbesondere verletzungsfern nachzuweisen ist (Cavaillon et al., 2001; Mannick et al., 2001; Moore et al., 1996; Bone, 1996; Schinkel et al., 2001b; Pellegrini et al., 2000; Walsh et al., 2000; Schinkel et al., 2001a; Faist et al., 1996; Nast-Kolb et al., 1997).

#### 1.4 Humorale Mediatoren:

Beim lokalen mechanischen Gewebeschaden, beispielsweise durch Quetschung, kommt es zur Freisetzung immunologisch aktiver Metabolite. Bedeutend sind reaktive Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid und Eikosanoide. Diese aktivieren Granulozyten, Makrophagen und Monozyten zur Diapedese ins Gewebe und zur Synthese inflammatorischer Zytokine (Wang et al., 2004). Sowohl der klassische (Weiser et al., 1996; Hill et al., 1992) als auch der alternative Weg (Fosse et al., 1987) des Komplementsystems werden als Bestandteil des unspezifischen Immunsystems aktiviert. Die dabei freigesetzten Komplement-Spaltprodukte, wie beispielsweise *C5a* (Hoch et al., 1993) und *platelet-activating-factor (PAF)* aktivieren ihrerseits zelluläre Bestandteile des Immunsystems (Khreiss et al., 2004). Immunkompetente Zellen opsonieren und phagozytieren Gewebetrümmer und eingedrungene Mikroorganismen. Ebenfalls wird die Synthese von Zytokinen wie beispielsweise *TNF $\alpha$* , *IL-1*, *IL6* und *IL-8* angeregt (Oberholzer et al., 2005; Remick et al., 2005; Hoch et al., 1993). Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Metabolite (z.B. Zytokine, Proteasen, Inhibitoren)

werden während eines posttraumatischen *SIRS* vermehrt synthetisiert und freigesetzt (Pape et al., 2001; Gebhard et al., 2000; Majetschak et al., 2000; Keel et al., 1996; Ertel et al., 1998; Gutteridge & Halliwell, 2000; Kirsch & de Groot, 1999). In diesem Zusammenhang haben andere Autoren (Hoch et al., 1993; Rabinovici et al., 1993; Svoboda et al., 1994; Ertel et al., 1995; Neidhardt et al., 1997; Gebhard et al., 2000; Majetschak et al., 1999) in vorausgegangenen Studien eindeutig belegt, dass entgegen Resultaten aus Zellexperimenten die Konzentrationen von pro- als auch antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen in der systemischen Zirkulation polytraumatisierter Patienten verändert sind. Unter physiologischen Bedingungen ist die Immunantwort durch pro- und antiinflammatorische Zytokine im Gleichgewicht. Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion, kann es zu einer generalisierten Freisetzung von meist proinflammatorischen Zytokinen kommen, die hierbei das natürliche Gleichgewicht beeinträchtigen (Bone, 1996). Überwiegen dagegen antiinflammatorische Zytokine, kommt es zu einer abgeschwächten Immunantwort, die die Infektabwehr des Patienten erheblich reduziert. Welche intrazellulären Schlüsselmechanismen hierfür maßgeblich verantwortlich sind, ist jedoch bisher nur unzureichend charakterisiert.

### 1.5 Zelluläre Mechanismen

Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der initialen posttraumatischen Immunreaktion scheint das unspezifische zelluläre Immunsystem zu spielen [Übersichtsarbeiten siehe: Mannick et al., 2001; Faist et al., 1996; Schinkel et al., 1998]. Durch das zeitlich früher aktivierte unspezifische Immunsystem wird das spezifische Immunsystem ebenfalls aktiviert. Dem Monozyten/Makrophagensystem wird eine tragende Rolle in der T-Zell- und B-Zell-Aktivierung durch Synthese und Freisetzung von inflammatorisch und antiinflammatorisch wirksamer Zytokine zugeschrieben [Übersichtsarbeit siehe: Walsh

et al., 2000; Zedler et al., 1999; Hassoun et al., 2001]. Darüber hinaus wird phagozytiertes Fremdantigen zusammen mit der Expression des *Major Histocompatibility Complex* der Klasse II (*MHC II*) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, wie beispielsweise den Makrophagen, präsentiert. Hiermit sind die Voraussetzungen für eine Aktivierung der T-Lymphozyten geschaffen. Aktivierte T-Lymphozyten sind ebenfalls zur Synthese von Zytokinen, die auch als Lymphokine bezeichnet werden, fähig. Im Sinne eines *Circulus vitiosus* wird eine weitere Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten-Population sowie eine erneute Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen induziert.

Die Herkunft der phagozytierten Antigene, die zur Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen notwendig sind, ist bis heute nicht endgültig geklärt. In den letzten Jahren wurde die Beteiligung von Bakterien für die Entwicklung eines *SIRS* diskutiert. Hierbei wird dem Ischämie/Reperfusion-Phänomen des gastrointestinalen Trakts einerseits durch direkte traumatische Schädigung, andererseits indirekt durch Zentralisation im Volumenmangelschock eine besondere Bedeutung zugeschrieben [Übersichtsarbeit siehe: Deitch et al., 1996; Hassoun et al., 2001]. Durch Reperfusion des ischämischen Areals kommt es zur Einschwemmung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren. Die ischämische Darmwand erleichtert pathogenen Keimen eine Passage vom Darmlumen in das interstitielle Gewebe. Hier ist die Entzündungsreaktion auf das Vorhandensein von Fremdantigen zurückzuführen (Baker et al., 1988; Deitch & Bridges, 1987; Rush, Jr. et al., 1988). Das posttraumatische *SIRS* ist aber auch ohne gastrointestinale Beteiligung beschrieben worden. Man geht davon aus, dass Ischämie/Reperfusion-Phänomene der Peripherie durch Freisetzung inflammatorisch und antiinflammatorisch wirksamer Metabolite mit verantwortlich für die Entwicklung eines *SIRS* sind (Oberholzer et al., 2005; Hoch et al., 1993; Moore et al., 1991). Durch die lebensnotwendige Reperfusion ischämischen Gewebes kann sich

dennoch der Gewebeschaden deutlich verschlechtern. Ursache dafür sind die eingeschwemmten und durch das unspezifische Immunsystem aktivierten Leukozyten, die mit dem Endothel des geschädigten Gewebes interagieren (Menger et al., 1992). Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie konnten Mechanismen beteiligter *Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen (LEI)* und die in diesem Zusammenhang entstandenen Beeinträchtigungen aufgeklärt werden [Übersichtsarbeit siehe: Lipton et al., 1999; Massberg & Messmer et al., 1998]. Notwendige Voraussetzung für die *LEI* ist die Expression von *Selektinen (P-Selektin, E-Selektin)* in Endothelzellen und auf Leukozyten (*L-Selektin*). Immunglobulinähnliche Adhäsionsmoleküle (*ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1, etc.*) und *Integrine* sind weitere Interaktionspartner, die die Adhärenz der Leukozyten an das geschädigte Endothel und die Fließeigenschaft durch das Blutgefäß regulieren [Übersichtsarbeit siehe: Krieglstein & Granger, 2001].

Die molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem sind nur unzureichend erforscht. Weitere alternative T-Zell-Aktivierungswege, die unspezifisches mit spezifischem Immunsystem verbinden, werden diskutiert [Übersichtsarbeiten siehe: Jordan et al., 2003; Nishibori et al., 2003; Rabb, 2002]. So stellen beispielsweise das aktivierte Komplementsystem durch Aktivierung von *Natural Killer Cells (NK-Zellen)*, als auch der von Monozyten exprimierte Faktor *Linker of activated T-cells (LAT)*, ohne Präsentation eines spezifischen Antigens mögliche Aktivierungskaskaden dar (Jordan et al., 2003). Das von aktivierten Monozyten sezernierte *Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)* hat hingegen eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Zellen, die *IL-2*-Synthese und den *IL-2*-Rezeptor. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von Monozyten und Makrophagen, als auch möglicherweise von Granulozyten, in der Induktion und Generalisierung der Entzündungsantwort nach Polytrauma beim Menschen. Bekannt sind bisher nur Serumkonzentrationen inflammatorischer und antiinflammatorischer Proteine. Die

Herkunft und die zugrunde liegenden intrazellulären Steuerungsmechanismen, die die posttraumatische Abwehrfunktion und die Synthese von Effektorproteine (Zytokine/ Chemokine, Zelloberflächenmoleküle, Proteasen, Inhibitoren, etc.) induzieren, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt (Keel & Trentz, 2005).

Zielsetzung dieser Arbeit war daher, zur näheren Charakterisierung intrazellulärer Steuerungsmechanismen in immunkompetenten Zellen nach Polytrauma, ausgewählte Proteine auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Die Antwort der Zelle auf den Reiz „Trauma“ wird nach heutigen molekularbiologischen Kenntnissen nur über die mRNA gesteuert, die die genetische Information aus dem Zellkern zum Zytoplasma transportiert [Übersichtsarbeit siehe: Kanehisa, 2001]. Die mRNA ist somit Bindeglied zwischen der kodierten Information im Zellkern und dem entstehenden Protein.

Über Trauma-sensitive mRNA-Expressionsmuster in Monozyten und PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten ist bisher jedoch sehr wenig bekannt. Anhand erster *Microarray-Untersuchungen* konnten semiquantitativ einige interessante Faktoren im posttraumatischen Verlauf in humanen Monozyten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, wie z.B.:

- i) das in diesem Zusammenhang gut untersuchte Zytokin *TNF $\alpha$*
- ii) das bislang nur in anderem Zusammenhang bekannte Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK*
- iii) die anhand zahlreicher Proteinuntersuchungen analysierte Protease *PMN-Elastase*
- iv) das Housekeeping Gen *HPRT*, das als konstant exprimiert in lebenden Zellen beschrieben wurde (Pernas-Alonso et al., 1999a)

Die Pilotstudie mittels *Microarray-Technik* ermöglichte 1156 Gensequenzen inflammatorisch und antiinflammatorisch wirksamer Proteine auf mRNA-Ebene qualitativ zu untersuchen, welche möglicherweise maßgeblich an der Induktion und

Aufrechterhaltung eines posttraumatischen *SIRS* mit folgendem Multiorganversagen beteiligt sind. Dies war Grundlage spezifische Faktoren im posttraumatischen Verlauf engmaschig quantitativ auf mRNA-Ebene nachzuweisen.

## **2. FRAGESTELLUNG**

Wie in der Einleitung dargestellt, scheint die Dysregulation immunkompetenter Zellen ursächlich für die Ausbildung einer generalisierten Entzündungsreaktion und einem daraus resultierenden posttraumatischen Multiorganversagen verantwortlich zu sein. Über die dabei möglicherweise Trauma-spezifischen, intrazellulären, initialen Steuerungsmechanismen ist hingegen nur wenig bekannt. Da die mRNA der Informationsträger zwischen Zellkern und Proteinsynthese ist, zeigt der quantitative Nachweis der mRNA von inflammatorischen und antiinflammatorischen Proteinen möglicherweise Trauma-spezifische Schlüsselmechanismen in immunkompetenten Zellen auf. In einer vorausgegangenen Pilot-Studie wurden mittels *Microarrays* in einem kleinen Patientenkollektiv *TNF $\alpha$*  und *TEC-PTK* als substantiell verändert durch das Ereignis „Trauma“ identifiziert. Die *PMN-Elastase* wurde bereits in Voruntersuchungen in Verbindung mit einem posttraumatischen Organversagen gesehen. Als Housekeeping Gen wurde *HPRT* untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, intrazelluläre pro- und antiinflammatorische Faktoren auf mRNA-Ebene in Monozyten und Granulozyten von Kontrollprobanden und polytraumatisierten Patienten näher zu charakterisieren. Im Detail wurden dabei folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Kann für die beschriebenen Proteine in Monozyten und Granulozyten von gesunden Kontrollprobanden mit den etablierten Zellisolutions- und mRNA-Analyse-Methoden die mRNA-Expression quantitativ bestimmt werden, sowohl unter nativen Bedingungen als auch nach Stimulation mit *LPS*?



2. Sind signifikante quantitative mRNA-Expressionsänderungen dieser Proteine in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten im frühen posttraumatischen Beobachtungszeitraum von 48 Stunden erkennbar?
3. Lassen sich diese Veränderungen bestimmten klinischen Merkmalen, wie z.B. Geschlecht oder Alter des Patienten zuordnen?

### **3. PATIENTEN UND METHODEN**

#### 3.1 Studienkollektive

Es wurden Patienten mit einem *Injury Severity Score (ISS)*  $\geq 16$  Punkten eingeschlossen, die innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma in die Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität eingeliefert wurden. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten oder ihren gesetzlichen Vertretern eingeholt. Ausgeschlossen wurden Patienten die innerhalb der ersten 24 Stunden verstarben oder ein isoliertes Schädelhirntrauma erlitten. Nach der initialen Stabilisierungsphase im Schockraum und den notwendigen Operationen wurden die Patienten auf der Intensivstation der Chirurgischen Klinik Innenstadt weiterbehandelt. Um das Ausmaß des posttraumatischen Organversagens erfassen zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt die Parameter zur Berechnung des *MOF-Scores* nach *Goris* in der Modifikation nach *Lefering et al.* notiert (Lefering et al., 2002; Waydhas & Nast-Kolb, 1998). Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten (Ruchholtz et al., 1997).

### 3.1.1 Kontrollkollektiv

Als gesundes Kontrollkollektiv dienten sechs junge Probanden, 3 männliche und 3 weibliche, ohne Trauma in den letzten Monaten. (siehe Tabelle 1)

<b>Tabelle 1</b>	Geschlecht	Alter
Proband 1	männlich	30
Proband 2	männlich	33
Proband 3	männlich	34
Proband 4	weiblich	25
Proband 5	weiblich	26
Proband 6	weiblich	22

### 3.1.2 Patientenkollektiv

Es wurden 19 Patienten eingeschlossen, die innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma die Chirurgische Klinik und Poliklinik des Innenstadt-Klinikums der LMU erreichten und mindestens eine Verletzungsschwere von einem  $ISS \geq 16$  hatten. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die die ersten 48 posttraumatischen Stunden überlebten. Das Verletzungsmuster, der errechnete  $ISS$ , Geschlecht und Lebensalter, sowie die Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate und des *Fresh Frozen Plasmas* sind in Tabelle 2 aufgeführt. Ein klinisches Follow-up der Patienten erfolgte über 90 Tage.

<b>Tabelle 2</b>	<b>Verletzungsmuster</b>	<b>Alter</b>	<b>Ge- schle- cht</b>	<b>ISS</b>	<b>EK</b>	<b>FFP</b>	<b>Zustand nach 90 Tagen</b>
PT 1	SHT°II, schwere Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Leberruptur, Frakturen der oberen und unteren Extremitäten, subtotale Amputation	35	m	57	8	20	Hirntod 16 Tage nach Unfall
PT 2	Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Frakturen der oberen und unteren Extremitäten, retroperitoneales Hämatom	46	f	34	14	10	Körperliche Rehabilitation
PT 3	SHT°II, Lungenkontusion, komplette Beinamputation beidseits	53	f	41	5	2	Rollstuhl, keine neurologischen Ausfälle
PT 4	SHT°III, offene Frontobasisfraktur, Trommelfellperforation, Felsenbeinquer- und Längsfraktur, chronische Hepatitis B	53	m	45	1	0	Neurologische Rehabilitation, keine neurologischen Defizite
PT 5	SHT°I, Lungenkontusion, Wirbelkörperfraktur, Trümmerfraktur untere Extremität	48	m	34	10	6	Eingeschränkte Lungenkapazität, Polyneuropathie, körperliche Rehabilitation an Gehhilfen
PT 6	SHT°I, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, Frakturen der oberen und untere Extremitäten	53	m	27	1	0	Komplette Remission mit geringfügiger Gehbehinderung. Benutzung von Gehhilfen
PT 7	SHT°II, Halswirbelfraktur, Lungenkontusionen, offene Beckenfraktur, traumatische Amputation der oberen Extremität, Schulterluxation	33	m	40	40	50	Rechte Oberarmamputation, keine neurologischen Ausfälle, mobilisiert im Rollstuhl
PT 8	Abdominelles Kompartmentsyndrom, Lungenkontusionen bds., instabiler LWK 2/3/4 Fraktur, hämorrhagischer Schock, Rippenfraktur, Myokardkontusion, Nierenkontusion, Milzhämatom	33	m	34	16	38	Rehabilitationsklinik, Anus praeter
PT 9	SHT°I, Lungenkontusionen bds., hämorrhagischer Schock Oberschenkelamputation	38	m	33	25	22	Tod nach 80 Tagen

PT 10	SHT°III, Lungenkontusionen bds., Hämatopneumothorax, ICB, Rippenfraktur C2-8 links, C2 und 4 rechts, stumpfes Bauchtrauma	44	f	32	1	2	Rehabilitationsklinik
PT 11	Lungenkontusionen bds., Hämatopneumothorax, Rippenserienfraktur, Zwerchfellruptur, Myokardkontusion, Pneumoperikard, Symphysensprengung, subtrochantäre Femurfraktur	59	m	57	31	48	Tod durch <i>MOF</i> nach fünfwöchiger intensivmedizinischer Behandlung
PT 12	Lungenkontusion, stumpfes Bauchtrauma, sekundäre Pneumonie	23	m	20	0	0	Komplette Remission
PT 13	SHT°II mit SAB, Lungenkontusionen, Rippenfraktur, Scapulablattfraktur, offene Fibulafraktur	45	m	29	0	2	Rehabilitationsklinik, weitgehend mobilisiert
PT 14	Offene Unterschenkelfraktur, subkapitale Humerusfraktur, Weichteiltrauma von Schulter, Oberarm, Aspiration am Unfallort	33	m	16	11	32	Komplette Remission
PT 15	Lungenkontusion, Myokardkontusionen, Leberruptur, Pankreaskontusionen, Nierenkontusionen, Makrohämaturie, Contusio spinalis, C7/8 Wurzelläsion	24	m	34	34	49	Komplette Remission
PT 16	SHT°II, Lungenkontusionen, Rippenfrakturen, Sitz- und Schambeinastfraktur, posttraumatische Abduzensparese, Hemiparese	29	m	41	9	14	Schwerbehindert bei neurologischem Defizit bei schwerem SHT
PT 17	Distale Femurträgerfraktur, Os ilium Fraktur, Os pubis Fraktur, Patellaträgerfraktur, OSG-Luxationsfraktur, Lungenkontusionen, Rippenfraktur	57	f	16	0	0	Rehabilitationsklinik, Lähmungen der unteren Extremitäten
PT 18	SHT°I, Lungenkontusionen, Pneumothorax, Rippenfrakturen, Hämatothorax, Beckenfraktur	75	m	24	1	3	Rehabilitation, weitgehend vollmobilisiert
PT 19	Femurschaftfraktur, Unterschenkelfraktur, Kalkaneusluxationsfraktur, Rippenserienfraktur, Lungenkontusionen, Sitzbeinfraktur, Dornfortsatzabriss, Querfortsatzabriss	40	f	34	3	16	Rehabilitationsklinik, mobilisiert mit Gehwagen

**Tabelle 2:** PT=Polytrauma, ISS= Injury Severity Score, EK= Erythrozytenkonzentrat, FFP= Fresh frozen plasma

### 3.2 Probengewinnung und Zellisolation

Die Blutabnahmen erfolgten entsprechend dem Protokoll direkt bei Klinikaufnahme (innerhalb der ersten 90 Minuten nach Unfall) und dann standardisiert 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Unfallgeschehen. Die Zellisolation erfolgte magnetisch mit der *MACS-Methode* (*Magnetic-activated cell sorter = MACS*). Pro Blutentnahme wurden 30ml venöses Vollblut mit *EDTA*-Blutröhrchen entnommen (4x 7,5ml *EDTA*-Röhrchen). Aus dem Blut wurden die Monozyten mittels *Microbeads* (*Miltenyi-Biotec*) isoliert, die mit Antikörpern gegen *CD14* (*Miltenyi-Biotec*) beschichtet waren. Die Granulozyten wurden ebenfalls mittels *Microbeads* isoliert, die mit Antikörpern gegen *CD15* (*Miltenyi-Biotec*) beschichtet waren. Zur Sicherung der Reinheit der Zellpopulation wurde anhand von Normalprobanden (n=3) eine Durchflußzytometrie (*Fluorescence-activated cell sorter = FACS*) mittels *CD14*-Antikörper (*Beckmann-Coulter*) durchgeführt. Dabei fand sich eine Population mit  $87 \pm 3\%$ . Das Epitop *CD14* kann auch auf der Oberfläche von aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimiert werden (Bassoe et al., 2000). Eine derartige Kontamination in unseren Proben konnte jedoch mittels *Side Scatter* Analyse ausgeschlossen werden. Ebenso wurde die Reinheit der *CD15*-positiven Granulozyten überprüft. Es fand sich eine Population von  $92 \pm 4\%$ . Die isolierten Zellen wurden in 2ml *RLT Puffer* lysiert (*Qiagen, Hilden, Deutschland*), welcher 0,1% *beta-Mercaptoethanol* enthielt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die mRNA-Extraktion erfolgte nach den Angaben und Produkten von *RNeasy Midi Kit* (*Qiagen*).

Jedem der vier 7,5ml *EDTA*-Blutabnahmeröhrchen wurden 42,5ml Lysepuffer hinzugefügt, um die Erythrozyten bei 10-minütiger Wirkzeit zu lysieren.

**Tabelle 3:** Lysepuffer für einen Liter mit pH 7,2

	KHCO <sub>3</sub> 10 mM	NH <sub>4</sub> Cl 155mM	EDTA 0,1mM
ad 1l aqua dest	1g	8,29g	200 µl

Um die Leukozyten von Serum und Erythrozyten zu trennen, wurden die Proben bei 450xg und 20°C 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nochmals Lysepuffer (5-10ml) hinzugefügt und zentrifugiert, um die vollständige Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten. Das Zellpellet wurde in 500µl *PBS/EDTA-Puffer* resuspendiert (*phosphate buffered saline containing 2mM EDTA*).

**Tabelle 4:** 1x *PBS-Puffer* für einen Liter mit pH 7,2-7,4

	NaCl	KCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1l aqua dest	8g	0,2g	1,44g	0,24g

Die vorhandene Gesamtzellzahl wurde anhand einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:1000 mittels einer *Neubauer Zählkammer* mikroskopisch ausgezählt. Es wurde eine definierte Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen in 80µl entnommen und mit 200µl *CD14*-Antikörper-assoziierten *Microbeads* (*Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA*) für 15min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Volumen mittels *PBS/EDTA-Puffer* auf 15ml aufgefüllt und die Zellen mit einem weiteren Zentrifugationsschritt sedimentiert (450xg, 10min, 20°C). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde wieder mit 500µl *PBS/EDTA-Puffer* resuspendiert und auf eine Hochgradientenzellseparationssäule pipettiert (*Miltenyi Biotec*). Diese wurde zuvor mit 500µl *PBS/EDTA-Puffer* gespült. Die im Magnetfeld befindliche Säule wurde dreimal mit 3x500µl *PBS/EDTA-Puffer* gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und mit einem sterilen Stempel in einen 15ml Falcon gedrückt. Dieser wurde wieder bei 450xg und 20°C 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Das Pellet, das nun die isolierten Monozyten enthielt, wurde mit *RLT-Puffer* (*Qiagen*) resuspendiert und bei -80°C bis zum nächsten Schritt gelagert. Der

*RLT-Puffer* wurde vor Gebrauch mit *2-β-Mercaptoethanol* versetzt (pro 1ml *RLT-Puffer* je 10µl *2-β-Mercaptoethanol*). Die Isolation *CD15*-tragender Granulozyten erfolgte mit *CD15*-Antikörper-assoziierten *Microbeads* (*Miltenyi-Biotec*). Die Granulozyten wurden nach dem ersten Auftragen der Zellsuspension mit *CD14*-Antikörper-assoziierten *Microbeads* auf die Magnetsäule im Durchlauf aufgefangen und mit *CD15*-Antikörper-assoziierten *Microbeads* (*Miltenyi-Biotec*) inkubiert. Das Auftragen auf die Magnetsäule erfolgte in 1ml *PBS-Puffer* und es folgten 3 Waschschrte mit jeweils 3ml *PBS-Puffer*. Die gereinigten Zellen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ebenfalls in 2ml *RLT/2-β-Mercaptoethanol-Puffer* aufbewahrt. Die RNA wurde nach Anleitung des Herstellers mittels *RNeasy Midi Kit* (*Qiagen*) extrahiert. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Monozyten und Granulozyten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit dem *Vortexer* homogenisiert. Die Zellzahl wurde erneut in einer *Neubauer Zählkammer* bestimmt. Die Suspension wurde dann 5min bei 300xg in einem RNase-freien Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 4ml *RLT/2-β-Mercaptoethanol-Puffer* resuspendiert und nochmals mit dem *Vortexer* 10sec homogenisiert. Um die Zellen zu zerstören wurde das Lysat nun 5-10mal durch eine Kanülenspritze aufgezogen und ausgedrückt. Nun wurde 1 Volumenteil (VT) 70%-iger *Ethanol* hinzugefügt und durchgemischt. Die Suspension wurde auf RNase-freie Säulen aufgetragen (*RNeasy Midi Kit*). Diese Säulen wurden in einem 15ml Falcon verschlossen. Der Falcon wurde bei 3000xg 5min zentrifugiert und die durchgeflossene Suspension verworfen. Auf die Säule wurde jetzt 2,0ml *RWI-Puffer* zum Waschen gegeben und 5min bei 3000xg zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde wieder verworfen. An dieser Stelle wurde ein DNase-Verdau mit 20µl *DNase Stock Solution* (RNase-freies Wasser + DNase I) und 140µl *RDD-Puffer* durchgeführt, die schon gemischt und zentrifugiert auf die Säulenmembran gegeben wurden und 15min bei Raumtemperatur inkubierten. Es wurden erneut 2,0ml *RWI-Puffer* auf die Säule gegeben und weitere 5min inkubiert, anschließend bei 3000xg zentrifugiert und die

durchgeflossene Suspension verworfen. Jetzt wurde 2,5ml *RPE-Puffer* auf die Säule aufgetragen, das Röhrchen verschlossen und 2min bei 3000-5000xg zum Waschen zentrifugiert. Die Waschsuspension wurde verworfen. Ein erneuter Reinigungsschritt erfolgte mit 2,5ml *RPE-Puffer* bei 3000xg für 5-10min mit anschließender Zentrifugation zum Trocknen. Die Säule wurde vorsichtig aus dem Röhrchen entfernt und in ein neues Röhrchen gestellt. Mit 150µl RNase-freiem Wasser wurde die Säulenmembran benetzt und bei geschlossenem Deckel 1min inkubiert und danach bei 3000xg erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde erneut mit 250µl RNase-freiem Wasser durchgeführt. Photometrisch wurde jetzt die RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen.

### 3.3 Real-Time PCR

Vorbereitung:

Von der gewonnenen RNA wurde 1µg in 8,2µl zur copyDNA-Synthese (cDNA) eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde anhand des Protokolls des Herstellers (*Roche*) und den dazugehörigen Materialien des Kits durchgeführt. (*1st Strand cDNA Synthesis Kit* für RT-PCR, *Roche Mannheim, Deutschland*). Die totalRNA wurde zuvor bei 65°C 15min denaturiert und 5min auf Eis gelagert.

**Tabelle 5:** Master Mix

10xReaction Buffer	25mM MgCl <sub>2</sub>	Oligo-p(dt) <sub>15</sub> Primer	RNase- Inhibitor	AMV Reverse Transkriptase
2,0µl	4,0µl	2,0µl	1,0µl	0,8µl

Der *Master Mix* wurde mit der RNA (1µg in 8,2 µl) für 10min bei +25°C und danach 60min bei +42°C inkubiert. Nach diesen 60 Minuten wurde die *AMV Reverse Transkriptase* bei



+99°C 5min denaturiert und bei +4°C 5min gekühlt. Die nun synthetisierte cDNA wurde bei -20°C bis zur RT-PCR mittels *LightCycler* aufbewahrt.

Mittels RT-PCR können definierte Nukleotid-Sequenzen quantitativ gemessen werden. Die cDNA wird wie in einer herkömmlichen PCR amplifiziert. Zu jeder Probe wird *SYBR<sup>®</sup>Green I*, ein fluoreszierender Farbstoff, gegeben. Dieser Farbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA und emittiert nur in diesem gebundenen Zustand Licht einer definierten Wellenlänge. Eine Photozelle im Gerät misst nach jeder Amplifikation die Intensität des emittierten Lichtes, wobei die Intensität von der Menge des gebundenen Farbstoffes abhängt, welcher direkt proportional zur vorhandenen Doppelstrang-DNA ist. So steigt die Fluoreszenzintensität schneller an, wenn zu Beginn schon viele Kopien einer Sequenz vorliegen, als bei einer Probe mit niedriger Kopienzahl. Die Spezifität einer Amplifikation wird durch die Schmelzkurve der Probe gesichert. Die Kopien einer Probe entsprechen nur dann der Ausgangssequenz, wenn alle, bei einem ihnen zugehörigen maximalen Temperaturwert, vollständig denaturiert sind, also in Einzelsträngen vorliegen und keine Fluoreszenzemissionen mehr besitzen.

Zur Durchführung wurde das Enzym- und Farbstoffsystem *FastStart DNA Master SYBR<sup>®</sup>Green I (Roche)* verwendet. Es wurde ein Reaktionsgemisch (RG, 10fach) aus Puffer, Farbstoff, Nukleotiden, MgCl<sub>2</sub> und Polymerase hergestellt. Die für die Durchführung notwendigen Substanzen wurden mit der Probe und den spezifischen Primern gemischt und in die speziell für den *LightCycler* vorgesehene Kapillaren gegeben, mit einem Deckel verschlossen und 1min bei 600xg in speziellen Adaptern zentrifugiert, um ihren Inhalt zu mischen. Während allen Arbeitsschritten wurden die Kapillaren in einem dafür vorgesehenen lichtundurchlässigen Kühlblock aufbewahrt, um die Enzyme und den Farbstoff zu schützen. Die Primer wurden von der Firma *SEARCH LC (Heidelberg)* angefertigt.

**Tabelle 6:** Zur Durchführung der RT-PCR wurde folgendes Protokoll herangezogen:

Ansatz	RG	<i>LC-FastStart DNA SYBR® Green</i>	Primer	cDNA	H <sub>2</sub> O
<i>HPRT</i>	1 x	2µl	2µl	1µl	15µl
<i>TEC-PTK</i>	1 x	2µl	2µl	1µl	15µl
<i>PMN- Elastase</i>	1 x	2µl	2µl	1µl	15µl
<i>TNFα</i>	1 x	2µl	2µl	1µl	15µl

**Einstellungen für den RT-PCR Vorgang:**

**Tabelle 7:** Initiale Denaturierung

Programm	regular
Zyklenanzahl	1
Zieltemperatur	95°C
Inkubationszeit	10min
Temperaturanstieg (°C/ sec)	20°C/ sec
Fluoreszenzmessung	keine

**Tabelle 8:** Amplifikation

Programm	quantification		
Zyklenanzahl	45		
Zieltemperatur	95°C	68°C	72°C
Inkubationszeit	10sec	10sec	16sec
Temperaturanstieg (°C/ sec)	20°C/ sec	20°C/ sec	20°C/ sec
Fluoreszenzmessung	keine	keine	am Ende

**Tabelle 9:** Schmelzkurve

Programm	melting curve		
Zyklenanzahl	1		
Zieltemperatur	95°C	58°C	95°C
Inkubationszeit	keine	10 sec	keine
Temperaturanstieg (°C/ sec)	20°C/ sec	20°C/ sec	0,1°C/ sec
Fluoreszenzmessung	keine	keine	kontinuierlich

**Tabelle 10:** Kühlung des Gerätes

Programm	regular
Zyklenanzahl	1
Zieltemperatur	40°C
Inkubationszeit	30sec
Temperaturanstieg (°C/ sec)	20°C/ sec
Fluoreszenzmessung	keine

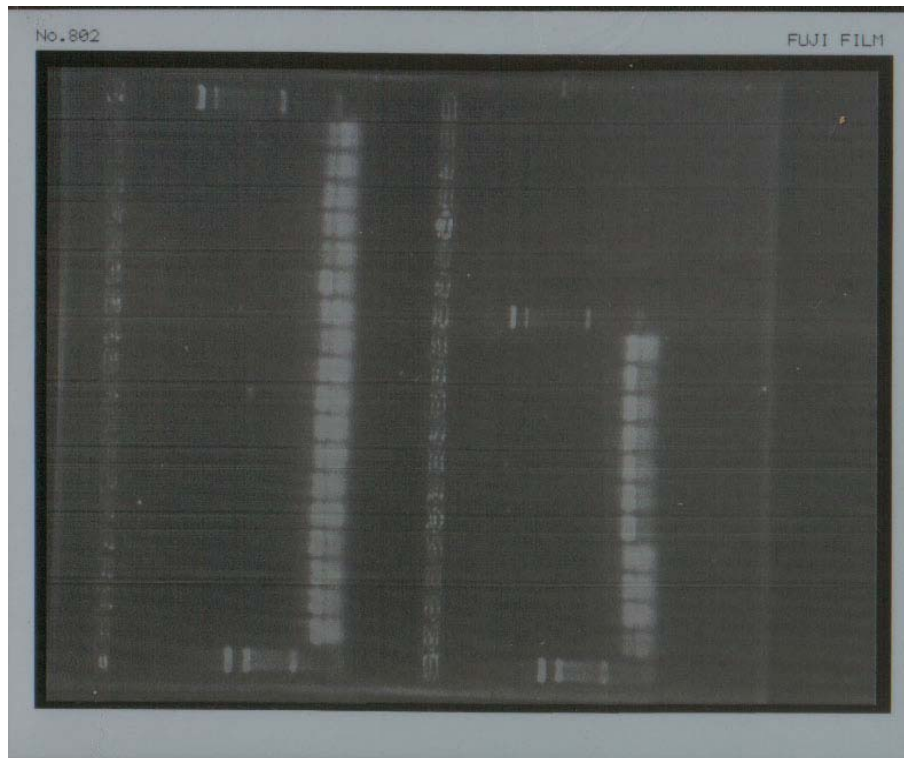
Auswertung:

Die Proben wurden mit der dazugehörigen Software ausgewertet. (*LightCycler Data Analysis Software*). Dabei wurde für jede Probe ein Kreuzungspunkt (*Crossing point*) definiert, der einen bestimmten Zyklus der Amplifikation markiert. Da sich die Kopienzahl der untersuchten Sequenz mit jedem Zyklus verdoppelt, bedeutet die Differenz von n Zyklen zwischen zwei Kreuzungspunkten dann einen  $2^n$ -fachen Unterschied der Kopienanzahl zwischen beiden Proben.

Die Kreuzungspunkte wurden über den *Second Derivative* Maximum-Algorithmus automatisch von der Software errechnet. Der Kreuzungspunkt ist dabei als erster Wendepunkt der Fluoreszenzkurve definiert (Kurvendiskussion: erstes Maximum der 2. Ableitung). Liegen zu Beginn viele Kopien in der Probe vor, so ist der Kreuzungspunkt schneller erreicht als bei einer niedrigen Anzahl von Kopien. Ein höherer Kreuzungspunkt bedeutet deshalb eine niedrigere Expression des untersuchten Gens. Anhand des Kreuzungspunktes können unterschiedliche Proben bzgl. der mRNA-Expression miteinander verglichen werden.

### 3.4. Flankierende Untersuchungen

Nach erfolgter RT-PCR wurden die amplifizierten Proben anhand eines 1,5%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. 1,8g *Agarosegelpulver* wurde in 120ml *Triacetat-EDTA (1xTAE)-Puffer* in *Aqua dest.* bei 1000 Watt 1,5min in der Mikrowelle erhitzt und gelöst und dann in eine 120ml Elektrophoresekammer gegossen. Bei Raumtemperatur wurde der Laufpuffer auf das abgekühlte und gefestigte Gel in die Gelkammer gegossen. Jede Patientenprobe wurde mit 2µl *blue juice* Farbmarker gefärbt und vorsichtig in die Geltaschen gegeben. Zur Kontrolle der Fragmentlänge wurden *100bp* und *250bp DNA ladder Marker* in 2 Geltaschen mit aufgetragen. Bei einer Spannung von 70 Volt (bei einer Stromstärke von 80mA) wurde die Gelelektrophorese durchgeführt. Nach Wanderung der negativ geladenen DNA-Stränge in Richtung Anode über 2/3 des Gels wurde die Spannung abgenommen. Das Gel wurde im *Ethidiumbromid*-Bad 5min gelagert. *Ethidiumbromid* interkaliert in die DNA und kann mittels UV-Licht auf Fotopapier sichtbar gemacht werden. Anhand der nun sichtbaren Nukleotid-Sequenzen, konnte die Reinheit der Proben durch identische Banden und somit übereinstimmende Länge der Sequenzen kontrolliert werden.



Gelelektrophorese am Beispiel von *TEC-PTK*

### 3.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit der Software *SigmaStat 2.03* statistisch ausgewertet. Zuvor wurden alle experimentellen Ergebnisse auf ihrer Reinheit und Spezifität untersucht. Es wurden für die einzelnen Werte der Stundenabnahmen der jeweiligen Gene für alle 19 Patienten jeweils der Mittelwert (MW) und die dazugehörige Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) berechnet. Ebenso wurde mit den gesunden Kontrollprobanden verfahren. Hierbei wurden die absoluten Kopienzahlen verglichen. Die hier gewonnenen Daten wurden mittels *Mann-Whitney-U-Test* und *Student-Neumann-Keuls-Test* miteinander verglichen bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Des Weiteren wurden die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede hinsichtlich Lebensalter und Geschlecht der Patienten untersucht. Hier wurden die Kopienzahlen auf den Ausgangswert bei Aufnahme normiert um einen Fehler durch interindividuelle Expressionsunterschiede zu vermeiden. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt unter Verwendung der Software *SigmaPlot*.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. Demographische und klinische Daten der Studienkollektive**

Es wurden 19 Patienten eingeschlossen. Das Alter lag zwischen 19 und 75 Jahren, das mittlere Alter lag bei  $42 \pm 3$  Jahren (MW $\pm$ SEM), 14 der Patienten waren männlichen und 5 weiblichen Geschlechts. Die Schwere der Verletzungen wurde anhand des initialen *Injury Severity Score (ISS)* beschrieben und lag im Mittel bei  $35 \pm 4$  Punkten (MW $\pm$ SEM). In den meisten Fällen handelte es sich um Verkehrsunfälle (Hochrasanztraumen auf Landstraßen und Autobahnen mit PKW oder Motorrad). 68% der Patienten erlitten ein Multiorganversagen innerhalb der untersuchten 48 Stunden nach Trauma und 3 der Patienten (16%) erlagen den Folgen des Traumas innerhalb der ersten 90 Tage. Um das posttraumatische Organversagen quantitativ erfassen zu können, wurden zu jedem Blutabnahmezeitpunkt die Parameter zur Berechnung des *MOF-Scores* notiert [nach *Goris* und in der Modifikation nach *Lefering et al.* (*Goris et al.*, 1985; *Lefering et al.*, 2002)]. Dokumentiert wurden ebenso die Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate (*RBC 300ml/Konzentrat*) und des *fresh frozen plasmas (FFP 300ml/Konzentrat)* im Blutabnahmezeitraum von 48 Stunden nach Trauma. Das klinische Outcome wurde nach 90 Tagen dokumentiert.

### **4.2. Probengewinnung und Zellisolation**

Die Blutabnahmen erfolgten innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma bei Aufnahme in die Klinik und dann standardisiert 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Unfallzeit. Es wurden pro Entnahmezeitpunkt aus 30ml Blut Monozyten und Granulozyten isoliert, mRNA extrahiert und mittels Real-Time PCR quantifiziert (Siehe Kapitel 3). Gleichzeitig wurde der *MOF-Score* zu jeder vorgesehenen Blutabnahme erneut bestimmt. Anhand dieses Scores wurde die objektive Bestimmung eines Multiorganversagens bei  $\geq 4$  Punkten festgesetzt (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:**

	Aufnahme	6h	12h	24h	48h	Lebend (-) vs. Tod (+)
PT 1	6	6	5	5	5	+
PT 2	2	2	0	0	0	-
PT 3	1	4	3	3	3	-
PT 4	2	3	3	3	4	-
PT 5	2	3	3	3	3	-
PT 6	0	1	0	1	1	-
PT 7	4	4	4	5	5	-
PT 8	4	5	3	5	5	-
PT 9	4	4	4	6	5	+
PT 10	4	4	3	4	4	-
PT 11	5	4	3	4	5	+
PT 12	2	2	2	2	2	-
PT 13	4	3	3	3	3	-
PT 14	3	4	4	4	3	-
PT 15	3	6	5	5	5	-
PT 16	4	4	4	3	3	-
PT 17	5	5	5	5	5	-
PT 18	1	1	2	1	2	-
PT 19	6	5	3	3	2	-

[*MOF-Score*=0-6; (-)=die ersten 90 posttraumatischen Tage überlebt; (+)=verstorben innerhalb der ersten 90 posttraumatischen Tage]

### 4.3 Real-Time PCR

Die *LightCycler*-Technologie wurde, wie bereits beschrieben, zum quantitativen Nachweis der mRNA-Expression traumasensitiver Gene genutzt. Da sich in einer ersten Pilot-Untersuchung mittels *Microarrays* die Faktoren *TEC-PTK* und *TNF $\alpha$*  als signifikant verändert zeigten, wurden diese in der vorliegenden Studie quantitativ gemessen. Darüber hinaus wurde das in anderen Studien beschriebene Protein *PMN-Elastase* ebenfalls quantitativ untersucht. Das konstant in den *Microarrays* exprimierte Gen *HPRT* sollte als *Housekeeping Gen* herangezogen werden. Eine Untersuchung hinsichtlich geschlechtsspezifischer und altersspezifischer Unterschiede wurde angeschlossen. Die Ergebnisse wurden als absolute Kopienzahl/Abnahmezeitpunkt dargestellt und auf signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollprobanden untersucht. Zur Untersuchung von alters- und geschlechtsspezifischen Unterschieden nach Trauma wurden die Ergebnisse auf den jeweiligen Wert bei Aufnahme normiert. Zur Kontrolle wurden die unten aufgeführten Faktoren in peripheren Monozyten und Granulozyten gesunder Probanden nativ und nach 4h Stimulation mittels *Lipopolysaccharid (LPS)* gemessen.

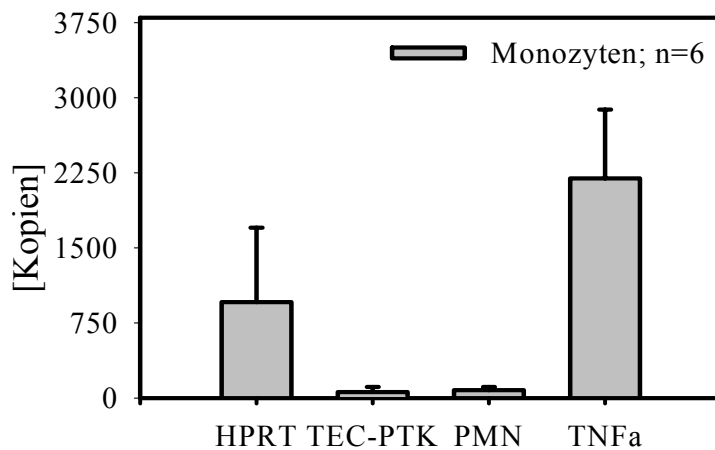
Die Menge an mRNA-Äquivalent wurde durch die standardisierte Menge an eingesetzter RNA daher in folgender Einheit bestimmt: [Anzahl der Kopien des Zielgens/50ng eingesetzter totalRNA]. Aus Gründen der übersichtlicheren Darstellung wurden in den folgenden Abbildungen die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR in Kopien angegeben (siehe Patienten und Methodenteil).



### 4.3.1 Kontrollkollektiv

In den folgenden Graphiken ist die mRNA-Expression der untersuchten Gene in Monozyten und Granulozyten in der Kontrollgruppe (n=6) dargestellt. Auf der Y-Ordinate sind die absoluten Kopienzahlen angegeben, auf der X-Abszisse befinden sich die untersuchten Gene. Es ist in allen Abbildungen der Mittelwert (MW) mit der dazugehörigen Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben.

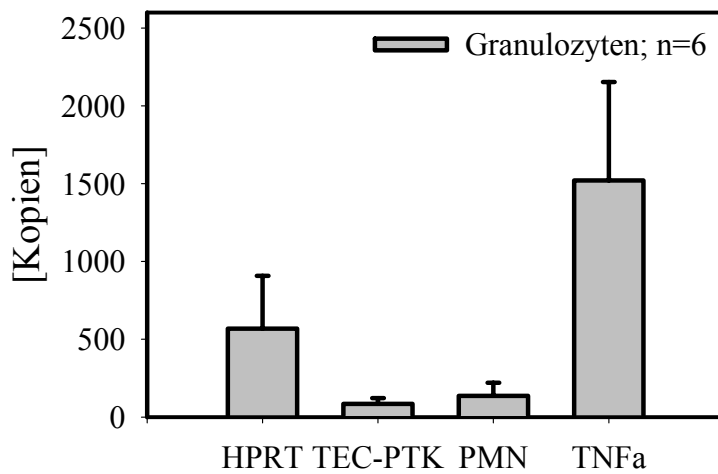
**Abbildung 2:**



**Abbildung 2**  
Übersicht der mRNA-Expression in Monozyten im Kontrollkollektiv; n=6

<b>Abbildung 2</b>	HPRT	TEC-PTK	PMN	TNFα
MW±SEM	958 ± 743	60 ± 51	79 ± 37	2190 ± 687

**Abbildung 3:**

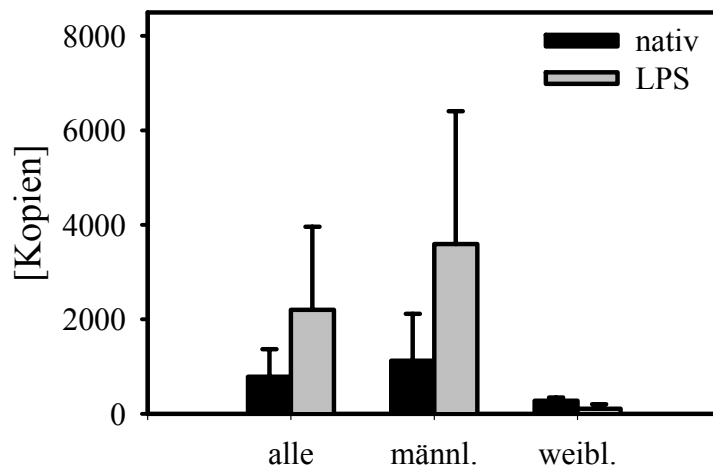


**Abbildung 3:**  
Übersicht der mRNA-Expression in Granulozyten im Kontrollkollektiv; n=6

<b>Abbildung 3</b>	HPRT	TEC-PTK	PMN	TNFα
MW±SEM	569±339	86 ± 36	137 ± 84	1521 ± 633

In den **Abbildungen 2 und 3** sind die absoluten Kopienzahlen als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert (MW±SEM) direkt nach Blutentnahme des gesamten Probandenkollektivs für *HPRT*, *TEC-PTK*, *PMN-Elastase* und *TNFα* in Monozyten und Granulozyten dargestellt. In den folgenden **Abbildungen 4 – 11** werden zunächst in Monozyten (**Abbildung 4-7**) und dann in Granulozyten (**Abbildung 8-11**) die absoluten Kopienzahlen direkt nach Blutentnahme und nach *LPS*-Stimulation gezeigt. Eine Untersuchung auf geschlechtsspezifische Unterschiede wurde sowohl nativ als auch nach *LPS*-Stimulation (*Lipopolysaccharid*) *in vitro* angeschlossen.

**Abbildung 4:**



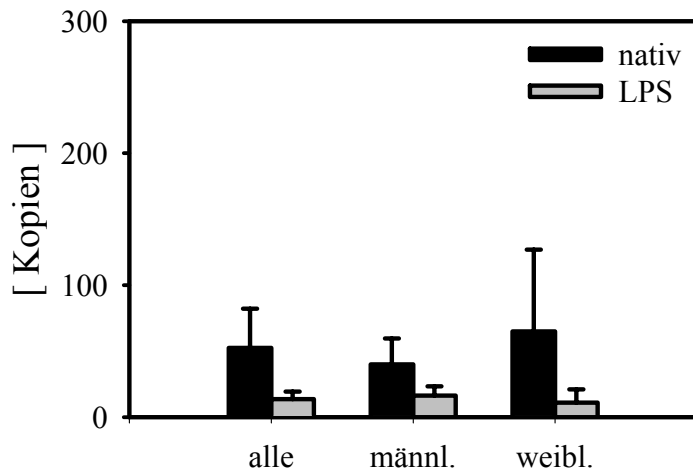
**Abbildung 4:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *HPRT* der Kontrollprobanden in Monozyten ohne und nach *LPS*-Stimulation; n=6

<b>Abbildung 4</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	958 ± 743	1100 ± 990	280 ± 55
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	2220 ± 1980	3600 ± 2800	110 ± 80

**Zu Abbildung 4:**

Es zeigten sich große interindividuelle Expressionsunterschiede für *HPRT*, sowohl vor als auch nach Stimulation. Eine signifikante mRNA-Expressionsänderung von *HPRT* in Monozyten der Kontrollprobanden nach *LPS*-Stimulation wurde jedoch nicht nachgewiesen. Eine deutlich geringere mRNA-Expression für *HPRT* ist bei weiblichen Kontrollprobanden erkennbar, sowohl nativ als auch nach Stimulation, jedoch ohne signifikanten Unterschied bezüglich des Geschlechts.

**Abbildung 5:**

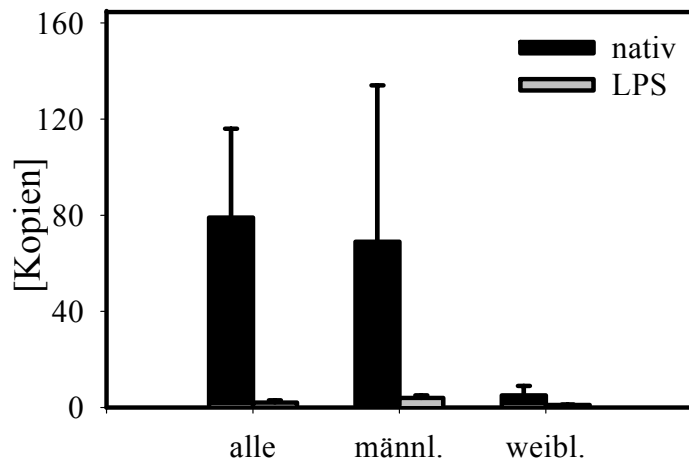


**Abbildung 5:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *TEC-PTK* der Kontrollprobanden in Monozyten ohne und mit *LPS*-Stimulation; n=6

<b>Abbildung 5</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	60 ± 51	40 ± 20	66 ± 62
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	17 ± 9	16 ± 7	11 ± 11

Aus **Abbildung 5** geht interessanterweise hervor, dass die mRNA-Expression für *TEC-PTK* durch *LPS*-Stimulation reduziert wird, sowohl bei den weiblichen als auch den männlichen Probanden. Ein signifikanter Unterschied nach *LPS*-Stimulation konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls bestand auch kein geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für *TEC-PTK* im Kontrollkollektiv.

**Abbildung 6:**

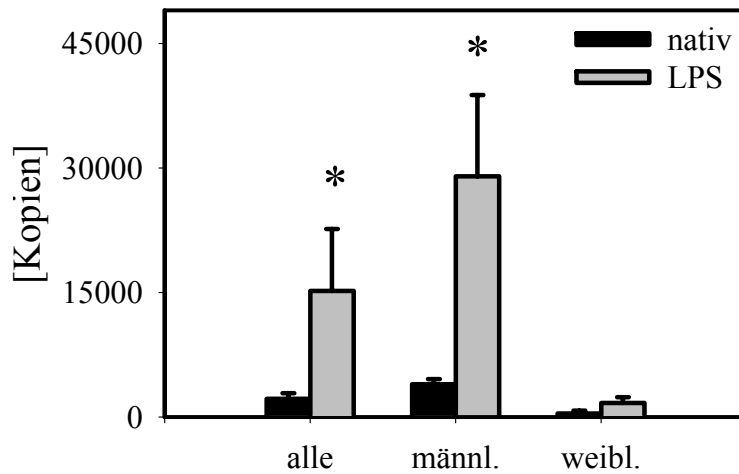


**Abbildung 6:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *PMN-Elastase* des Kontrollkollektivs in Monozyten; n=6

<b>Abbildung 6</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	79 ± 37	69 ± 65	5 ± 4
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	2 ± 1	4 ± 1	1 ± 0,2

**Abbildung 6** zeigt, dass eine Expressionsreduktion für die mRNA von *PMN-Elastase* in Monozyten der Kontrollprobanden nach Stimulation mit *LPS* deutlich erkennbar ist. Aufgrund einer großen interindividuellen Expressionsvarianz ergaben die Analysen keinen signifikanten Unterschied. Darüber hinaus ist ein geschlechtsspezifischer Expressionsunterschied erkennbar. In weiblichen Probanden wurde eine deutlich geringere mRNA-Expression vor Stimulation nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied wurde ebenfalls nicht nachgewiesen.

**Abbildung 7:**

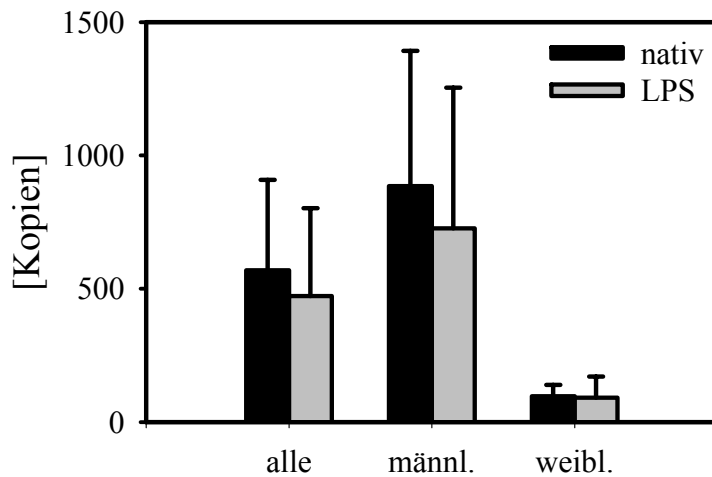


**Abbildung 7:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *TNFα* der Kontrollprobanden in Monozyten;  
\* =  $p < 0,05$ ;  $n = 6$

<b>Abbildung 7</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	2190 ± 687	3950 ± 610	430 ± 350
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	15200 ± 7450	29000 ± 9800	1700 ± 690

Die *TNFα* mRNA-Expression in Monozyten des Kontrollkollektivs wird durch Inkubation mit *LPS* stark stimuliert. Es besteht ein signifikanter mRNA-Expressionsanstieg nach Stimulation mit *LPS*. Ebenso geht aus **Abbildung 7** hervor, dass die männlichen Probanden eine signifikante Expressionserhöhung nach Stimulation erfahren. Bei den weiblichen Probanden ist durch Stimulation mit *LPS* keine Expressionserhöhung nachweisbar.

**Abbildung 8:**

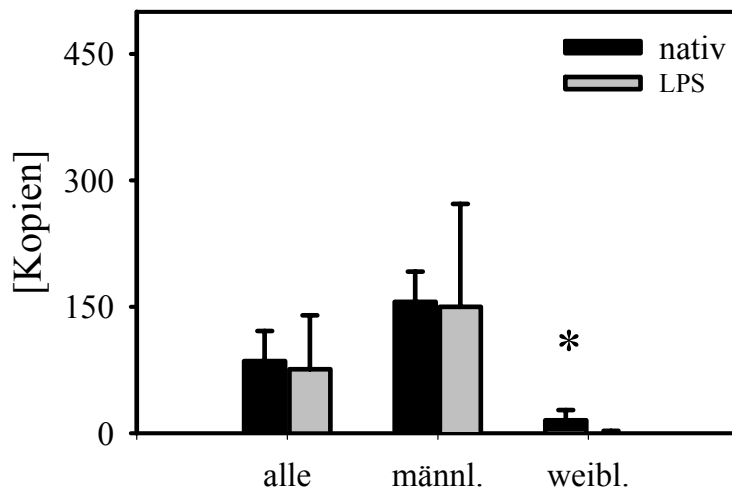


**Abbildung 8:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *HPRT* der Kontrollprobanden in Granulozyten;  
n=6

<b>Abbildung 8</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	569 ± 339	880 ± 510	97 ± 34
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	396 ± 279	730 ± 530	92 ± 65

**Abbildung 8** zeigt, dass durch Stimulation mit *LPS* keine signifikante mRNA-Expressionsänderung für *HPRT* in Granulozyten zu induzieren ist. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied der mRNA-Expression für *HPRT* ist sowohl nativ als auch nach Stimulation zu erkennen. In weiblichen Kontrollprobanden zeigt sich vor, als auch nach Stimulation, eine deutlich geringere mRNA-Expression für *HPRT*. Ein signifikanter Unterschied konnte bei kleiner Fallzahl und großer interindividueller Expressionsvarianz nicht nachgewiesen werden.

**Abbildung 9:**



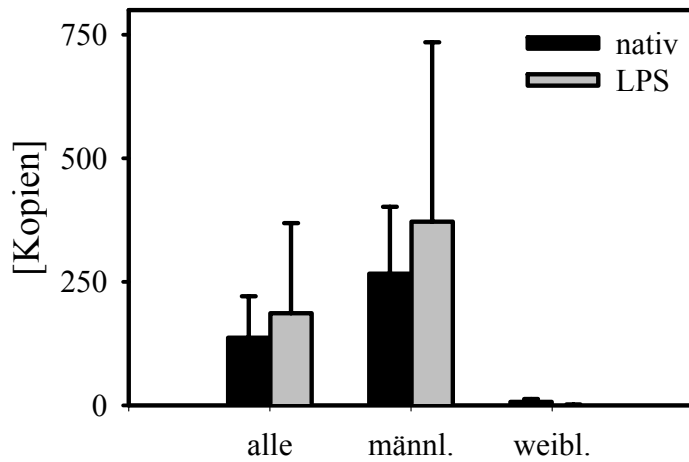
**Abbildung 9:**  
Übersicht der mRNA Expression von *TEC-PTK* der Kontrollprobanden in Granulozyten;  
\* =  $p < 0,05$ ;  $n = 6$

<b>Abbildung 9</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	86 ± 36	160 ± 36	15 ± 12
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	77 ± 64	150 ± 120	2 ± 1

**Abbildung 9** zeigt, dass durch *LPS*-Stimulation keine signifikante mRNA-Expressionsänderung für *TEC-PTK* induzierbar ist. Jedoch besteht ein signifikanter, geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied in Granulozyten für *TEC-PTK* vor Stimulation mit *LPS* in gesunden Kontrollprobanden. Im Vergleich zu den männlichen Probanden haben die weiblichen Probanden eine signifikant geringere mRNA-Expression für *TEC-PTK* in Granulozyten.



**Abbildung 10:**

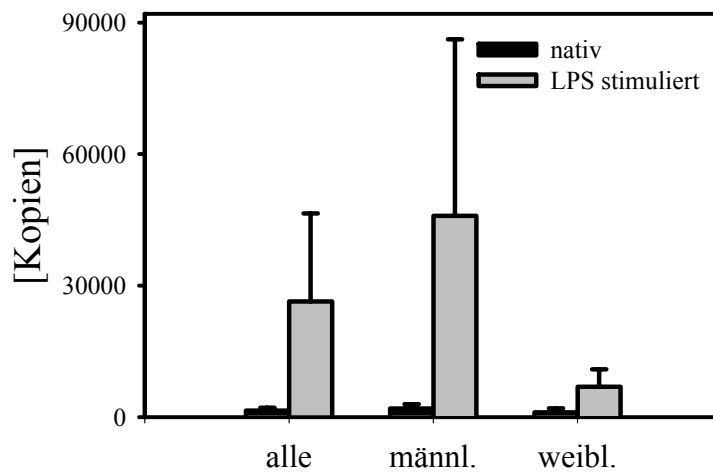


**Abbildung 10:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *PMN-Elastase* der Kontrollprobanden in Granulozyten;  
n=6

<b>Abbildung 10</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	137 ± 84	270 ± 140	7 ± 6
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	187 ± 182	370 ± 361	1 ± 0,5

**Abbildung 10** zeigt, dass die mRNA-Expression für *PMN-Elastase* in Granulozyten durch Stimulation mit *LPS* in gesunden Kontrollprobanden nicht signifikant geändert ist. Die weiblichen Kontrollprobanden haben eine deutlich geringere mRNA-Expression von *PMN-Elastase* als die männlichen Kontrollprobanden. Jedoch besteht kein signifikanter Unterschied.

**Abbildung 11:**



**Abbildung 11:**  
Übersicht der mRNA-Expression von *TNFα* der Kontrollprobanden in Granulozyten; n=6

<b>Abbildung 11</b>	gesamt	männlich	weiblich
Nativ MW±SEM	1521 ± 633	2000 ± 980	1100 ± 920
<i>LPS</i> stimuliert MW±SEM	26400 ± 20100	46000 ± 40000	7000 ± 4000

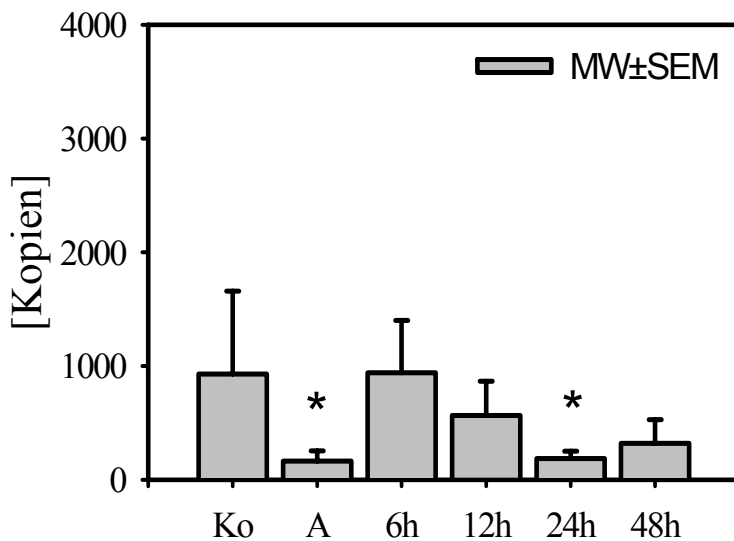
Die *TNFα* mRNA-Expression in Granulozyten wird durch Inkubation mit *LPS* stark stimuliert. Aufgrund der großen interindividuellen Expressionsvarianz besteht jedoch kein signifikanter Unterschied. Des Weiteren geht aus **Abbildung 11** hervor, dass vor allem die männlichen Kontrollprobanden eine deutlich gesteigerte *TNFα* mRNA-Expression durch *LPS*-Stimulation erfahren. Dies ist jedoch nur eine Tendenz ohne signifikanten Unterschied.

### 4.3.2 Patientenkollektiv

In den folgenden Abbildungen wird die quantitativ bestimmte mRNA der untersuchten Proteine in Monozyten und Granulozyten 19 polytraumatisierter Patienten präsentiert. Die Ergebnisse sind im zeitlichen Verlauf nach Trauma dargestellt. Die errechneten Mittelwerte der 19 Patienten wurden jeweils auf den Mittelwert der Kontrollgruppe bezogen. Für die alters- und geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden die absoluten Kopienzahlen im zeitlichen Verlauf jeweils auf die absolute Kopienzahl bei Aufnahme bezogen. Als signifikant wurde immer  $p < 0,05$  gewertet.

[Ko= Kontrollgruppe, A: mRNA-Expression bei Aufnahme in den Schockraum, 6h = 6 Stunden nach Unfall, usw.]

**Abbildung 12:** *HPRT* in Monozyten

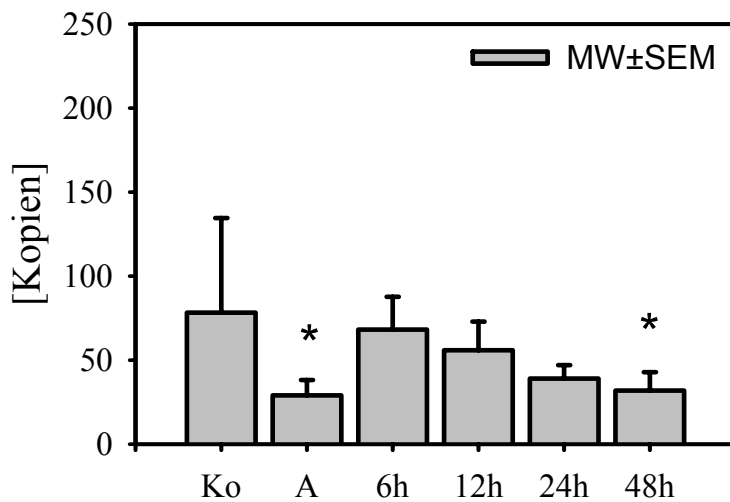


**Abbildung 12:**  
mRNA-Expression von *HPRT* in Monozyten polytraumatisierter Patienten im zeitlichen Verlauf;  
\*= $p < 0,05$ , n=19

Abb. 12	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	958 ± 743	215 ± 84	969 ± 558	731 ± 336	247 ± 43	334 ± 198

Aus **Abbildung 12** geht hervor, dass die mRNA-Expression für *HPRT* in Monozyten direkt nach Trauma, als auch 24h nach Trauma, signifikant reduziert ist. Somit liegt nahe, dass die *HPRT* mRNA-Expression durch das Ereignis Trauma signifikant verändert wird. *HPRT* ist in Monozyten somit nicht expressionsstabil und kann nicht als Housekeeping Gen herangezogen werden.

**Abbildung 13:** *TEC-PTK* in Monozyten

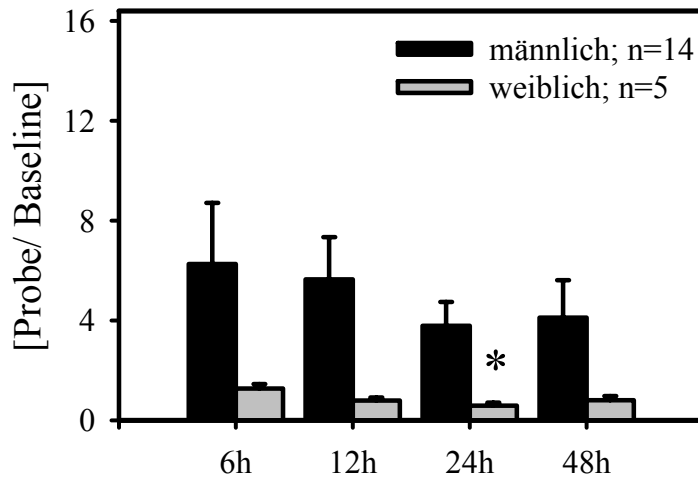


**Abbildung 13:**  
mRNA-Expression von *TEC-PTK* nach Polytrauma im zeitlichen Verlauf;  $*=p<0,05$ ,  $n=19$

<b>Abb.13</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	60 ± 51	23 ± 7	56 ± 14	52 ± 13	41 ± 6	36 ± 9

Aus **Abbildung 13** ist interessanterweise ersichtlich, dass das Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK* auf mRNA-Ebene in Monozyten direkt nach Trauma, als auch 48h nach Trauma eine signifikante Expressionsreduktion erfährt. Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Expression nach 6h, 12h und 24h nach Trauma nicht signifikant verändert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

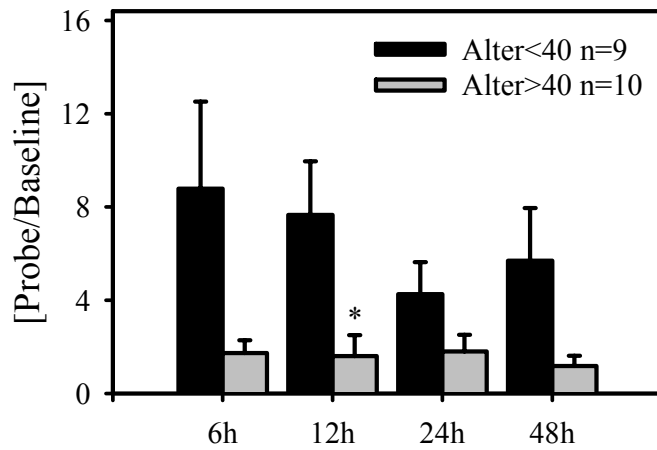
**Abbildung 14:**



**Abbildung 14:**  
mRNA-Expression in  
Monozyten von *TEC-PTK*  
nach Polytrauma  
hinsichtlich des  
Geschlechts;  
\* =  $p < 0,05$ ; n=19

**Abbildung 14** zeigt, dass die mRNA-Expression des Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK* nach Polytrauma in Monozyten geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist. Die mRNA-Expression von *TEC-PTK* der männlichen Patienten in Monozyten war bei allen Abnahmezeitpunkten um das 2-3 fache höher als bei den weiblichen Verletzten. 24 Stunden nach Trauma konnte ein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression zwischen männlichen und weiblichen Patienten gezeigt werden.

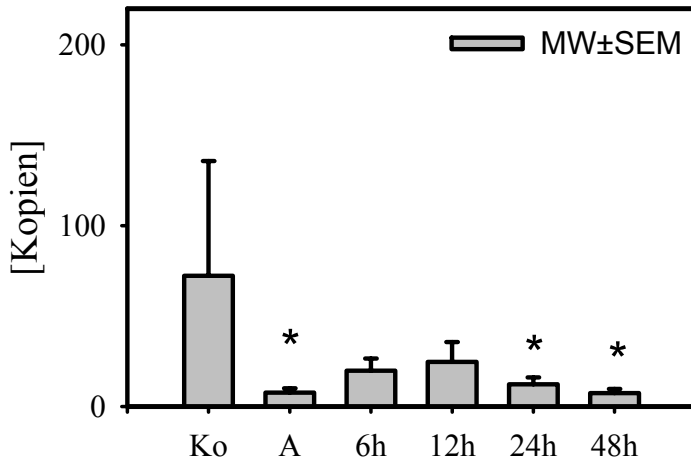
**Abbildung 15:**



**Abbildung 15:**  
mRNA-Expression in  
Monozyten von *TEC-PTK*  
nach Polytrauma  
hinsichtlich des Alters;  
\* =  $p < 0,05$ ;  $n = 19$

**Abbildung 15** zeigt, dass die mRNA-Expression von *TEC-PTK* in Monozyten nach Trauma möglicherweise vom Lebensalter des Patienten abhängig ist. Patienten vor dem 40. Lebensjahr hatten eine zu allen Abnahmezeitpunkten höhere mRNA-Expression von *TEC-PTK* als Patienten nach dem 40. Lebensjahr. Der Expressionsunterschied ist 12h nach Trauma bei Patienten nach dem 40. Lebensjahr signifikant reduziert.

**Abbildung 16:** *PMN-Elastase* in Monozyten

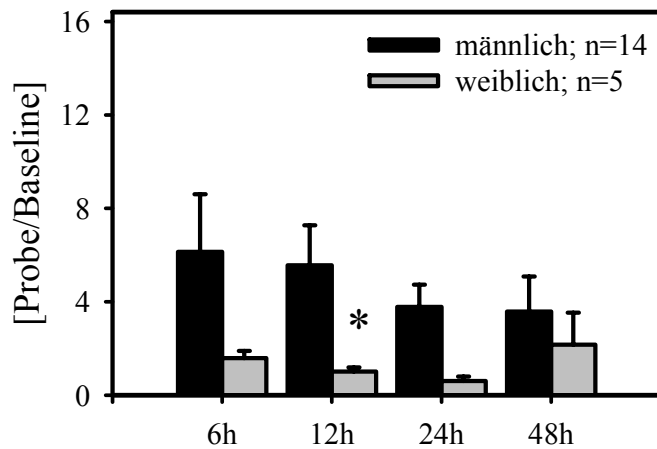


**Abbildung 16:**  
mRNA-Expression in  
Monozyten von *PMN-  
Elastase* nach Polytrauma  
\*= $p < 0,05$ ;  $n = 19$

<b>Abb.16</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	79±37	9 ± 0,4	18 ± 3	23 ± 6	11 ± 1	9 ± 0,3

**Abbildung 16** zeigt, dass in Monozyten ebenfalls eine signifikante Expressionsänderung für *PMN-Elastase* nach Trauma nachweisbar ist. So zeigte sich bei Aufnahme in den Schockraum, sowie 24h und 48h nach Trauma eine signifikante mRNA-Expressionsreduktion verglichen mit den gesunden Kontrollprobanden. 6h und 12h nach Trauma ist ebenfalls eine reduzierte mRNA-Expression für *PMN-Elastase* erkennbar, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

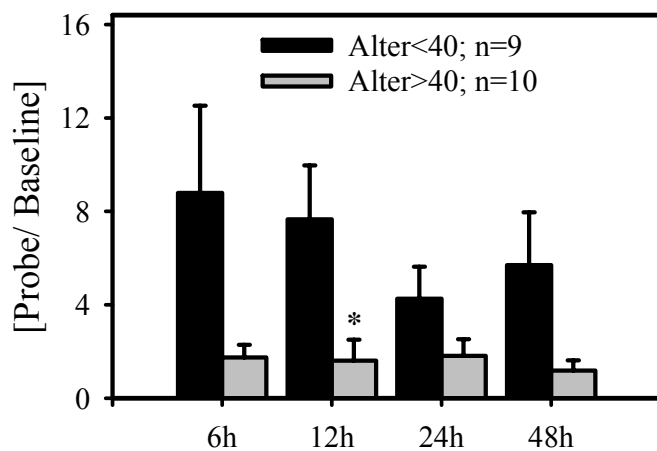
**Abbildung 17:**



**Abbildung 17:**  
mRNA-Expression in Monozyten von *PMN-Elastase* nach Polytrauma hinsichtlich des Geschlechts;  
\* =  $p < 0,05$ ; n=19

Wie aus **Abbildung 17** ersichtlich, ergaben die Untersuchungen, dass die mRNA-Expression der Protease *PMN-Elastase* in Monozyten einen geschlechtsspezifischen Unterschied in den ersten 48h nach Trauma aufweist. So wird die mRNA der *PMN-Elastase* von Patientinnen in der frühen posttraumatischen Phase zu allen Abnahmezeitpunkten deutlich reduziert exprimiert verglichen mit den männlichen Patienten. Nach 12h besteht ein signifikanter, geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied in Monozyten für *PMN-Elastase*.

**Abbildung 18:**

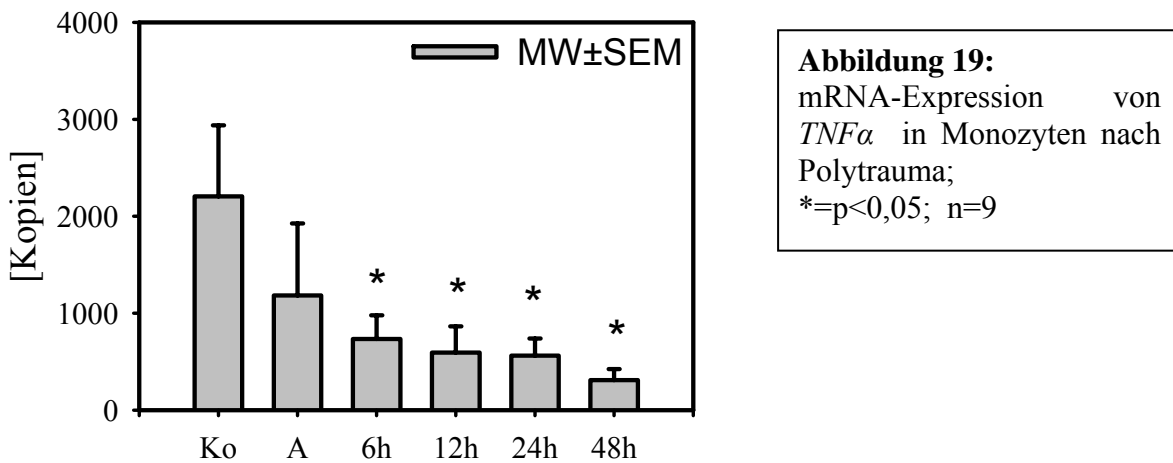


**Abbildung 18:**  
mRNA-Expression in Monozyten von *PMN-Elastase* nach Polytrauma hinsichtlich des Alters  
\* =  $p < 0,05$ ; n=19



**Abbildung 18** zeigt, dass die mRNA-Expression der *PMN-Elastase* in Monozyten möglicherweise nach Polytrauma vom Alter des Patienten abhängig ist. So wird die mRNA von *PMN-Elastase* in Monozyten der älteren Patienten zu allen fünf Untersuchungszeitpunkten deutlich weniger exprimiert als bei jüngeren Patienten. Nach 12h ist sogar die mRNA-Expression für *PMN-Elastase* bei Patienten nach dem 40. Lebensjahr signifikant geringer als bei den jüngeren polytraumatisierten Patienten.

**Abbildung 19:** *TNF $\alpha$*  in Monozyten

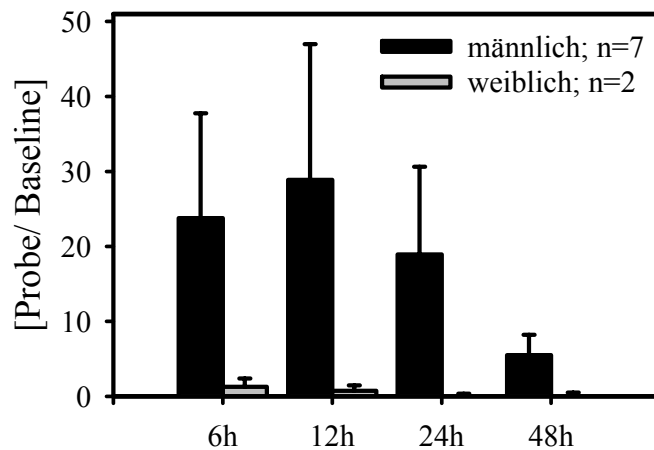


<b>Abb.19</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	2190±687	1140±671	693±221	538±253	532±124	331±91

**Abbildung 19** zeigt, dass eine zunehmende mRNA-Reduktion in den ersten 48 Stunden nach Trauma für *TNF $\alpha$*  in Monozyten nachweisbar ist. Eine reduzierte *TNF $\alpha$*  mRNA-Expression ist schon bei Aufnahme in den Schockraum ersichtlich. Nach 6h besteht bereits ein signifikanter mRNA-Expressionsunterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im weiteren

Verlauf zeigt sich 12h, 24h und 48h nach Trauma ebenfalls eine signifikante mRNA-Reduktion für *TNF $\alpha$*  in Monozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden.

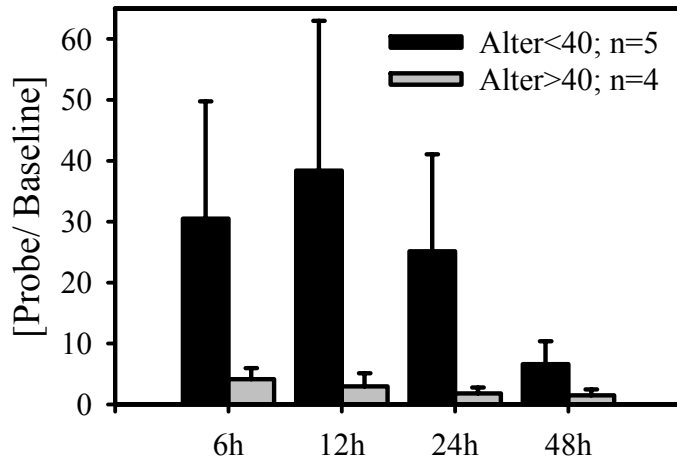
**Abbildung 20:**



**Abbildung 20:**  
mRNA-Expression in Monozyten von *TNF $\alpha$*  nach Polytrauma hinsichtlich des Geschlechts; n=9

**Abbildung 20** zeigt, dass in Monozyten deutliche, geschlechtsspezifische mRNA-Expressionsunterschiede für *TNF $\alpha$*  in der frühen posttraumatischen Phase bestehen. Patientinnen haben eine deutlich geringere mRNA-Expression für *TNF $\alpha$*  in Monozyten nach Trauma als männliche Verletzte. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch aufgrund der geringen Fallzahl und einer großen interindividuellen Expressionsvarianz nicht nachweisbar.

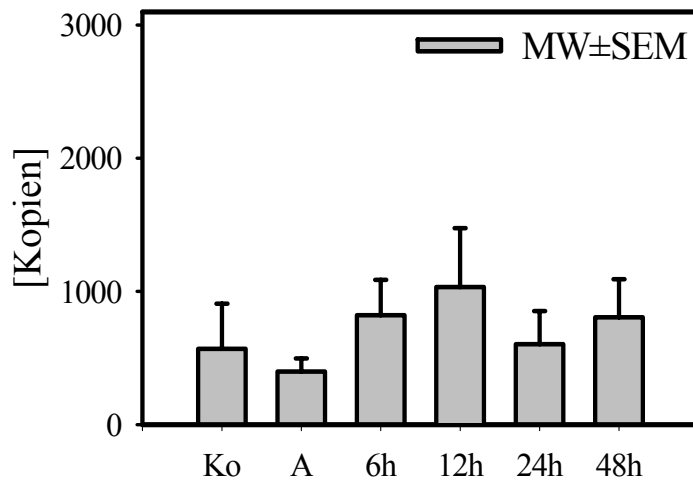
**Abbildung 21:**



**Abbildung 21:**  
mRNA-Expression in  
Monozyten von *TNFα* nach  
Polytrauma hinsichtlich des  
Alters; n=9

Wie aus **Abbildung 21** ersichtlich, zeigt sich in Monozyten von polytraumatisierten Patienten älter als 40 Jahre eine deutlich geringere mRNA-Expression für *TNFα* zu allen Beobachtungszeitpunkten. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Tendenz. Ein signifikanter Expressionsunterschied hinsichtlich des Lebensalters konnte zu den Beobachtungszeitpunkten nicht nachgewiesen werden.

**Abbildung 22:** *HPRT* in Granulozyten

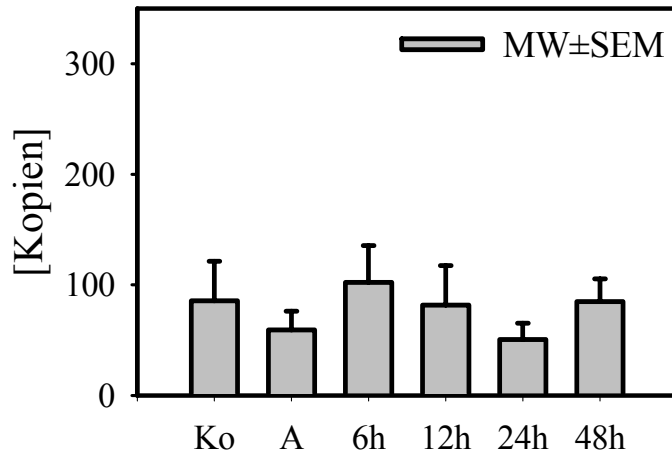


**Abbildung 22:**  
mRNA-Expression von *HPRT* in Granulozyten nach Polytrauma im zeitlichen Verlauf; n=19

<b>Abb.22</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	569±339	398±100	822±264	1033±442	605±248	807±285

**Abbildung 22** zeigt die mRNA-Expression von *HPRT* in Granulozyten im frühen posttraumatischen Verlauf. Zu keinem posttraumatischen Beobachtungszeitpunkt konnte ein signifikanter Expressionsunterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Die *HPRT* mRNA-Expression in Granulozyten wird durch Trauma nicht signifikant verändert.

**Abbildung 23:** *TEC-PTK* in Granulozyten

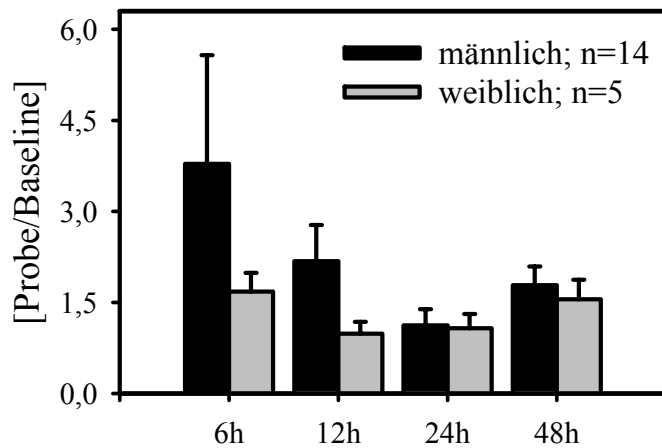


**Abbildung 23:**  
mRNA-Expression von *TEC-PTK* im frühen posttraumatischen Verlauf in Granulozyten; n=19

<b>Abb.23</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	86 ± 36	59± 17	102±33	82±36	50±15	85±21

**Abbildung 23** zeigt, dass im frühen posttraumatischen Verlauf die mRNA-Expression für *TEC-PTK* in Granulozyten zu keinem Abnahmezeitpunkt eine signifikante Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweist. Es konnte keine Traumasensitive Expressionsänderung für *TEC-PTK* in Granulozyten nachgewiesen werden.

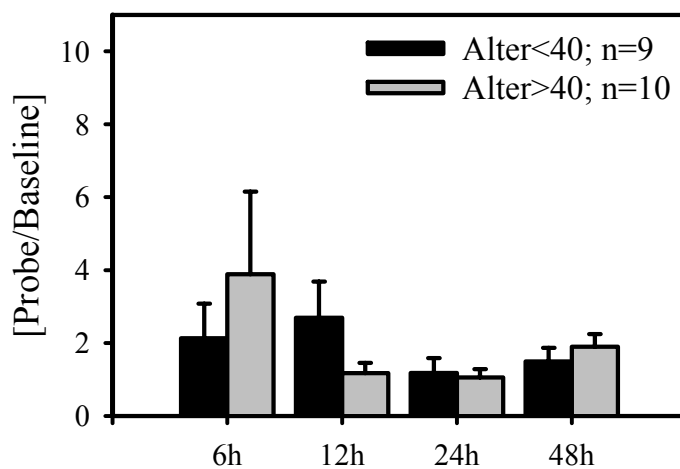
**Abbildung 24:**



**Abbildung 24:**  
mRNA-Expression in Granulozyten von *TEC-PTK* nach Polytrauma hinsichtlich des Geschlechts; n=19

**Abbildung 24** zeigt, dass in Granulozyten für *TEC-PTK* ebenfalls kein geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied besteht. Signifikante mRNA-Expressionsänderungen wurden über den posttraumatischen Beobachtungszeitraum von 48 Stunden nicht nachgewiesen.

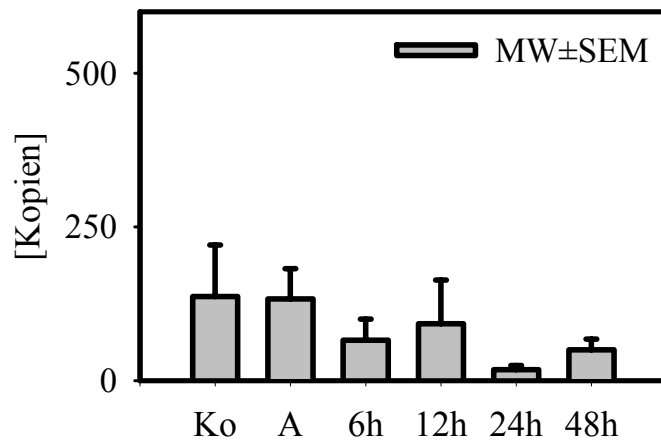
**Abbildung 25:**



**Abbildung 25:**  
mRNA-Expression in Granulozyten von *TEC-PTK* nach Polytrauma hinsichtlich des Alters; n=19

**Abbildung 25** zeigt, dass in Granulozyten kein altersspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für *TEC-PTK* nachweisbar ist. Das Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK* wird über den posttraumatischen Beobachtungszeitraum von 48h stabil exprimiert ohne signifikante mRNA-Expressionsunterschiede hinsichtlich des Lebensalters.

**Abbildung 26:** *PMN-Elastase* in Granulozyten

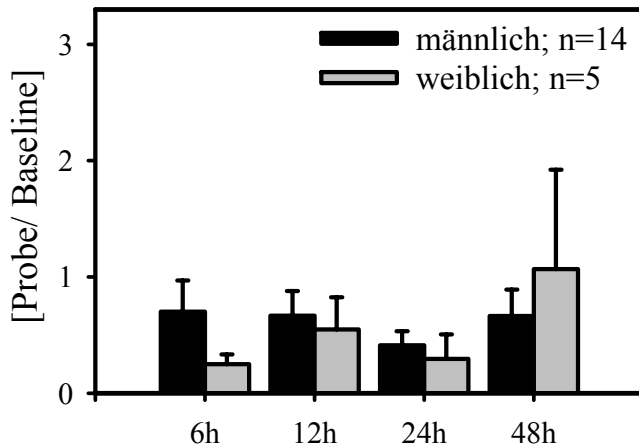


**Abbildung 26:**  
mRNA-Expression in Granulozyten von *PMN-Elastase* polytraumatisierter Patienten; n=19

<b>Abb.26</b>	Ko	A	6h	12h	24h	48h
MW±SEM	137±84	133±49	66±34	92±71	18±7	50±17

In **Abbildung 26** wird gezeigt, dass in Granulozyten nach Polytrauma zu allen Entnahmezeitpunkten ebenfalls kein signifikanter mRNA-Expressionsunterschied für *PMN-Elastase* im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar ist. Die *PMN-Elastase* wird auf mRNA-Ebene in der frühen posttraumatischen Phase stabil exprimiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist nach 24h ist eine deutliche, jedoch nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression für *PMN-Elastase* erkennbar.

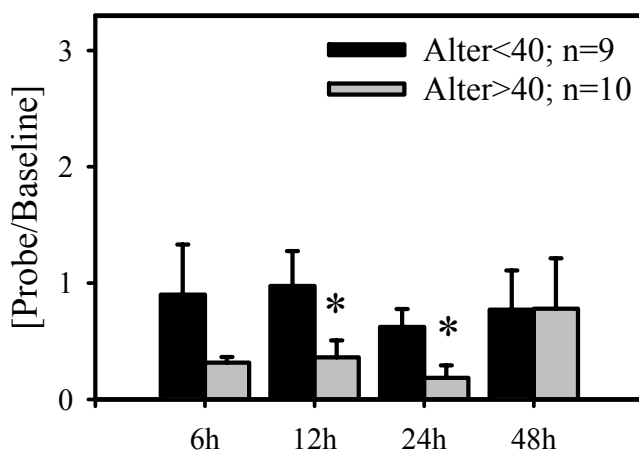
**Abbildung 27**



**Abbildung 27:**  
mRNA-Expression in Granulozyten von *PMN-Elastase* nach Polytrauma hinsichtlich des Geschlechts; n=19

Aus **Abbildung 27** ist ersichtlich, dass die mRNA-Expression für *PMN-Elastase* in Granulozyten nach Trauma keinen geschlechtsspezifischen Unterschied aufweist. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt besteht ein signifikanter Expressionsunterschied.

**Abbildung 28:**



**Abbildung 28:**  
mRNA-Expression in Granulozyten von *PMN-Elastase* nach Polytrauma hinsichtlich des Alters; \*= p<0,05; n=19

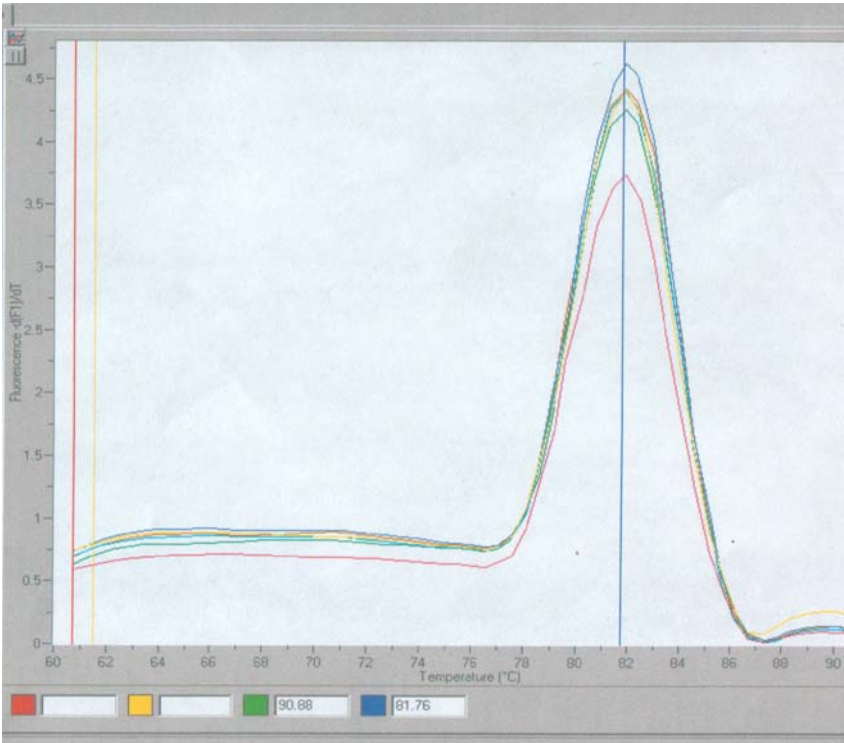


**Abbildung 28** zeigt, dass im frühen posttraumatischen Verlauf ein altersabhängiger mRNA-Expressionsunterschied für *PMN-Elastase* in Granulozyten besteht. Schon 6h nach Trauma haben die Patienten älter als 40 Jahre eine deutlich geringere mRNA-Expression von *PMN-Elastase* in Granulozyten. Nach 12h und 24h besteht ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den jüngeren und den älteren Patienten.

#### 4.4 Flankierende Kontrolluntersuchungen:

Die mittels RT-PCR quantitativ bestimmten mRNA-Expressionen wurden durch eine spezifische Schmelzkurve auf die Reinheit des PCR-Produkts überprüft. Darüber hinaus wurde nach erfolgter Amplifikation mittels Gelelektrophorese nochmals die Reinheit überprüft. Bei unspezifischen Schmelzkurven und Erhalt von Nebenprodukten in der Gelelektrophorese durch eventuelle Kontamination wurden die Messungen wiederholt. Beispielhaft sind in **Abbildung 29** die Schmelzkurven der mRNA für *HPRT* in Monozyten von 5 Blutentnahmen eines polytraumatisierten Patienten dargestellt. Aus der **Abbildung 29** ist ersichtlich, dass alle 5 untersuchten Patientenproben für *HPRT* spezifisch sind, da sie alle bei dem gleichen maximalen Temperaturwert vollständig denaturiert vorliegen und keine Fluoreszenz mehr gemessen werden kann.

**Abbildung 29:** Schmelzkurve der RT-PCR für *HPRT* in Monozyten



## 5. DISKUSSION

### 5.1 Allgemeines

Bis heute ist unklar, welche intrazellulären Mechanismen für die Entstehung eines posttraumatischen Multiorganversagens verantwortlich sind. Bereits bekannt ist, dass dem unspezifischen Immunsystem eine Schlüsselrolle zukommt (Hietbrink et al., 2006; Faist et al., 1996; Bone, 1996). In dieser Arbeit werden quantitative Ergebnisse auf mRNA-Ebene initialer, intrazellulärer Aktivierungsmechanismen in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten präsentiert. Ausgesuchte Faktoren, denen eine potentielle Rolle bei der initialen posttraumatischen Immunantwort zugeschrieben wurden (Biberthaler et al., 2003), wurden unter Verwendung der Real-Time PCR auf mRNA-Ebene in Kontrollprobanden nativ und nach Stimulation mit *LPS*, sowie in der frühen posttraumatischen Phase von 48h nach Polytrauma quantitativ nachgewiesen. Des Weiteren wurden die Ergebnisse auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede untersucht.

### 5.2 Demographische und klinische Daten:

Es wurden ausschließlich Patienten mit einem *ISS*  $\geq$  16 Punkten untersucht, die innerhalb der ersten 90 Minuten nach Verletzung unseren Schockraum erreichten und die folgenden 48 Stunden überlebten. Die epidemiologischen Daten, wie Alter und Geschlecht, als auch das Verletzungsmuster entsprechen dem Durchschnitt von Traumapatienten in Mitteleuropa (vgl. Tab. 2). Nordamerikanische Traumapatienten haben beispielsweise häufiger penetrierende Verletzungen (Sauaia et al., 1995; Ertel et al., 1998). Die Dokumentation der präklinischen und klinischen Daten erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten (Ruchholtz et al., 1997). Die Blutproben wurden bei Aufnahme in die Klinik innerhalb von 90 Minuten nach Trauma, sowie standardisiert 6h, 12h, 24h und 48h nach Trauma entnommen, um einen

möglichst engmaschigen Verlauf der mRNA-Expression in Monozyten und Granulozyten nach Trauma zu erfassen. Dennoch sind die Phasen der immunologischen Antwort auf Trauma nicht durchgängig dokumentiert. Es musste gewährleistet sein, dass durch die Blutentnahmen die Überlebenschancen und Genesung des Patienten nicht zusätzlich gefährdet war. Deshalb beschränkten wir uns auf 5 Entnahmen innerhalb der ersten 48 Stunden. Die Blutentnahmeintervalle wählten wir um unsere Ergebnisse möglichst gut mit schon durchgeführten Experimenten und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichen zu können. Es wurde hier vor allem ein erstes 6 Stundenintervall gewählt, da andere Autoren in vorhergehenden Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung ebenfalls dieses Intervall nutzten (Botha et al., 1995b; Ertel et al., 1995; Faist et al., 1993; Schinkel et al., 1998; Botha et al., 1995a). Klinische Parameter, wie beispielsweise der Blutdruck, wurden zu den untersuchten Blutabnahmezeiten dokumentiert und anhand eines Score-Systems, dem *MOF-Score* (Goris et al., 1985; Lefering et al., 2002), verifizierbar transformiert. Dies ermöglichte uns, die polytraumatisierten Patienten in Gruppen einzuteilen (*MOF-Score* < 4 Punkte: es liegt kein relevantes Multiorganversagen vor, *MOF-Score* ≥ 4 Punkte: relevantes Multiorganversagen liegt vor). Die Transformation kontinuierlicher Dichotome birgt jedoch die Gefahr von Fehlerquellen, da die physiologischen Parameter vielen Einflüssen unterliegen. So kann die Gabe von Medikamenten, zum Beispiel Katecholaminen, den Blutdruck ändern. Dennoch muss die Komplexität und Schwere der unterschiedlichen Verletzungsmuster und der nachfolgenden physiologischen Reaktionen vergleichbar gemacht werden, um sie in diesem Kontext auswerten zu können.

Die lebensnotwendige Gabe von Blutprodukten gibt unserer Studie einen kritischen Aspekt. Es wäre theoretisch denkbar, dass aus der Blutbahn des Patienten teilweise vom Blutspender stammende Leukozyten isoliert wurden, die das Untersuchungsergebnis verfälschen, da die transfundierten Erythrozytenkonzentrate zwar Leukozyten filtriert, jedoch nicht bestrahlt

waren und  $0,5$  bis  $0,7 \times 10^6$  Leukozyten pro Konzentrat enthielten (Rebulla et al., 1993). Dies entspricht, bei einem mittleren Volumen von 300ml pro Konserve, einer Konzentration von ca. zwei Zellen pro  $\mu\text{l}$ . Davon sind ca. 10% ( $0,2/\mu\text{l}$ ) Monozyten. Bei einer normalen Leukozytenverteilung im Schwerverletzten von  $5.000/\mu\text{l}$  finden sich bei 10% Monozyten im Differentialblutbild dann ca. 500 Monozyten/ $\mu\text{l}$ . Die theoretische zugeführte Menge an fremden Zellen liegt damit bei ca. 0,4% der zirkulierenden Monozyten. Granulozytenpopulationen sind im Normalfall bei 70-80%. So findet sich in 5000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  im Differentialblutbild ca. eine Population von 3750 Granulozyten/ $\mu\text{l}$ . 1,5 Granulozyten/ $\mu\text{l}$  wären theoretisch Spenderzellen. Prozentual ausgedrückt sind somit 0,05% der Granulozyten Spenderzellen. Daher kann diese Fehlerquelle weitgehend vernachlässigt werden.

### 5.3 Probengewinnung und Zellisolation

Für die Separation der Monozyten und Granulozyten nutzten wir die Technik der *positiven immunomagnetischen Zellseparation (MACS)* unter Verwendung von *Anti-CD14-* und *Anti-CD15-positiven Microbeads*. Die *CD14*-Antikörper-assoziierten *Microbeads* können zu einer leichten Aktivierung von Monozyten führen, da das *CD14*-Epitop eines der sensibelsten Regionen für intrazelluläre Aktivierung der Monozyten darstellt (Guha & Mackman, 2001). Alternativ wäre die Methode der *negativen immunomagnetischen Zellseparation (MACS)* möglich (Cotter et al., 2001). Diese Technik hat den Vorteil, dass sie ebenfalls hoch sensitiv ist und die separierten Zellen nicht aktiviert. Nachteilig ist, dass man ein größeres Blutvolumen benötigt, um die gleiche Anzahl von Zellen zu erhalten. Aus diesen Gründen entschieden wir uns für die *positive MACS-Methode*, da diese nur eine maximale Vollblutentnahme von 30ml je Abnahmezeitpunkt forderte und somit selbst dem Schwerstverletzten zumutbar war. Andere Autoren bedienten sich der

*Dichtegradientenzentrifugation* (Angele & Faist, 2002) mittels *Ficoll* oder *Percoll*. Monozyten und Granulozyten werden durch diese Technik stärker aktiviert als mit der *positiven immunomagnetischen Zellseparation* (Mc Donald et al., 1997, Schinkel et al., 2001b). Es ist bekannt, dass diese Methode durch den mechanischen Stress der Zentrifugation und den Kontakt mit hochmolekularen Zuckerverbindungen eine Aktivierung der Immunzellen hervorruft (Zahler et al., 1997).

Die mRNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR (siehe Kapitel 3.2 und 3.3) waren von einigen Autoren zuvor etabliert worden (Zong et al., 1999; Bustin, 2000; Giulietti et al., 2001).

#### 5.4 Real-Time PCR:

Die Analyse von Zytokinprofilen und Signaltransduktionsproteinen auf mRNA-Ebene ist von großer wissenschaftlicher Bedeutung, um funktionelle Kapazitäten von Immunzellen zu erfassen. Die RT-PCR wird heutzutage genutzt, um quantitative Expressionsprofile in Zellen zu bestimmen. Anders als mit der herkömmlichen PCR ist es mit der RT-PCR möglich, Gene nicht nur höchst sensitiv nachzuweisen, sondern auch Gensequenzen quantitativ zu erfassen. Mittels RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit, quantitativ die mRNA-Expression im frühen posttraumatischen Verlauf nachgewiesen. Die im Versuchsaufbau gemessene Schmelzkurve lässt eine eindeutige Aussage über die Spezifität der amplifizierten mRNA-Sequenzen zu. Darüber hinaus wurde das amplifizierte Produkt in der Gelelektrophorese auf Reinheit kontrolliert. Ist nur eine Bande einer spezifischen Basenpaarlänge zu finden, kann von einer reinen Probe mit Amplifikation des gesuchten Gens ausgegangen werden.

#### 5.4.1. Kontrollkollektiv

Es wurde zunächst die mRNA-Expression von gesunden Kontrollprobanden untersucht. Hier untersuchten wir eine native Kontrollgruppe ohne Stimulation und nach einer 4-stündigen *LPS-Stimulation in vitro*. Interessanterweise ergab die Bestimmung der *TEC-PTK* mRNA in Normalprobanden eine Reduktion der Expression nach *LPS-Stimulation*, welche jedoch nicht signifikant war. Die Reduktion betraf die männlichen und weiblichen Kontrollprobanden nach *LPS-Stimulation* in gleichem Maße. Dies ist ein Hinweis auf eine posttraumatische Immundysfunktion, da *TEC-PTK* eine tragende Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen im Rahmen der initialen Abwehrreaktion zu zukommen scheint (Schmidt et al., 2004a; Mano, 1999b). Eine vergleichbare Dynamik wies die Expression der *PMN-Elastase* auf. Hier zeigte sich in weiblichen Probanden eine deutliche Reduktion nach Stimulation, jedoch ohne Signifikanz. Im Gegensatz dazu stieg die mRNA-Expression von *TNF $\alpha$*  in Monozyten gesunder Probanden nach *LPS-Stimulation* signifikant an. In männlichen Probanden war die mRNA-Expression für *TNF $\alpha$*  nach Stimulation um ein Vielfaches gegenüber den weiblichen erhöht. In der Literatur wurde bereits in früheren Studien ein erhöhter *TNF $\alpha$* -Spiegel im Serum nach *LPS-Stimulation* beschrieben (Guha et al., 2001).

In Granulozyten ist kein Expressionsunterschied für *TEC-PTK* nach *LPS-Stimulation* erkennbar. Es fand sich jedoch ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied. Weibliche Kontrollprobanden hatten eine signifikant geringere *TEC-PTK* mRNA-Expression im Vergleich zu den männlichen Kontrollprobanden. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass das Geschlecht bei der posttraumatischen Immundysfunktion eine wichtige Komponente des Risikoprofils darstellt. Die Expression der *PMN-Elastase* in Granulozyten ändert sich weder in männlichen noch in weiblichen Probanden durch *LPS-Stimulation*. Es ist anzumerken, dass unabhängig von der Stimulation männliche Probanden eine deutlich höhere *PMN-Elastase* mRNA-Expression aufweisen, jedoch ohne signifikanten Unterschied. In Granulozyten ist die

*TNF $\alpha$*  mRNA-Expression ebenfalls durch *LPS* stark zu stimulieren. Männliche Probanden haben eine deutlich höhere *TNF $\alpha$*  mRNA-Expression als weibliche Probanden. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht. In der Zusammenschau der Ergebnisse von den Kontrollprobanden wurde gezeigt, dass mittels *LPS*-Stimulation, die mRNA-Expression für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* in Monozyten reduziert wird. Diese Ergebnisse gehen einher mit der posttraumatisch reduzierten mRNA-Expression polytraumatisierter Patienten für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase*. Vermutete These ist hier, dass durch den zugeführten Stress, hier mittels *LPS* simuliert, eine Reaktionsminderung der Monozyten zu erkennen ist. In Granulozyten zeigte sich dieses Phänomen nicht. Jedoch war auch hier auffällig, dass ein geschlechtsspezifischer Unterschied der mRNA-Synthese zu erkennen ist, welcher möglicherweise ebenfalls den weiteren posttraumatischen Verlauf mitbestimmen könnte.

#### 5.4.2 Patientenkollektiv

Es wurde erstmalig beschrieben, dass die *TEC-PTK* mRNA-Expression in Monozyten im Vergleich zu den Normalprobanden nach Trauma bei Aufnahme in den Schockraum und 48h nach Trauma signifikant vermindert ist. Dies spricht für eine reduzierte immunologische Antwort, die in anderen Studien klinisch als *CARS* beschrieben wurde und mit einer reduzierten Infektabwehr einhergehen kann (Mannick et al., 2001). Diskutiert wird hier eine Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, z.B. *nuclear factor kappaB* (*NF- $\kappa$ B*) (Stegmaier et al., 2006), die weitere intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflussen könnten (Biberthaler et al., 2004b; Matsukawa et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass *NF- $\kappa$ B* in Monozyten polytraumatisierter Patienten ab dem ersten posttraumatischen Tag eine veränderte transkriptionale Aktivität aufweist und somit eine verminderte Expression des Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK* vermitteln könnte (Stegmaier et al., 2006; Guha & Mackman, 2001; Muller et al., 1997; Mc Donald et al., 1997). Das mRNA-Expressionsprofil



zahlreicher nachgeschalteter Gene könnte dadurch signifikant verändert werden, beispielsweise von *PMN-Elastase* und *TNF $\alpha$*  (Hauser et al., 1995; Biberthaler et al., 2004). Ähnliches fand sich auch für die mRNA der *PMN-Elastase* in Monozyten, die bei Aufnahme, nach 24h und 48h signifikant vermindert gegenüber der mRNA-Expression im Kontrollkollektiv war. Die mRNA-Expression dieser inflammatorisch wirksamen Proteine wird in der frühen posttraumatischen Phase reduziert und mindert möglicherweise die Abwehrreaktion des Körpers. Die physiologische Funktion der Protease *PMN-Elastase* liegt in der Abwehr von Mikroorganismen und in der Digestion von Phagozytoseprodukten. Die Freisetzung und die proteolytische Aktivität wird unter normalen Bedingungen durch ihren natürlichen Inhibitor  $\alpha$ 1-PI stark kontrolliert (Korkmaz et al., 2005). Gerät das Gleichgewicht außer Kontrolle, kann es zu einer vermehrten Durchlässigkeit des Endothels und zu einer erleichterten Diapedese immunkompetenter Zellen in umliegendes Gewebe kommen, die die Entzündungsreaktion möglicherweise unterhalten (Moraes et al., 2003). Eine reduzierte Synthese von *PMN-Elastase* könnte mit einer reduzierten Immunfunktion (*CARS*) einhergehen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass den Monozyten eine tragende Rolle in der Entwicklung eines Multiorganversagens auf dem Boden eines *CARS* zukommt. Es ist jedoch nicht endgültig erwiesen, ob intravasale Monozyten tatsächlich eine Schlüsselfunktion für die posttraumatische Dysbalance des Immunsystems tragen. Endothelzellen könnten ebenfalls eine immunologische Schlüsselfunktion tragen. Eine Untersuchung von Endothelzellen polytraumatisierter Patienten ist jedoch aus ethischen Aspekten nicht vertretbar. Nur in wenigen Studien konnten erhöhte *TNF $\alpha$* -Plasmakonzentrationen in der frühen posttraumatischen Phase mit einer gesteigerten Mortalitätsrate und einer erhöhten *MODS*-Inzidenz assoziiert werden (Hildebrand et al., 2005a). Eine erhöhte posttraumatische *TNF $\alpha$* -Plasmakonzentration wurde von *Oberholzer* (Oberholzer et al., 2005) beschrieben, jedoch ohne signifikanten Anstieg. Für die Bereitstellung und Sezernierung sind verschiedene

Zelllinien wie beispielsweise Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Astrozyten, Endothelzellen, glatte Muskulatur und Fibroblasten verantwortlich.  $TNF\alpha$  ist ein hochwirksames Zytokin, welches hauptsächlich durch Kontakt des Organismus mit *Lipopolysaccharid* (*LPS*) gram-negativer Bakterien synthetisiert wird. Aber auch Entzündungsreaktionen ohne gram-negative Bakterien, sowie Infektionen durch andere Erreger und Umweltstimuli können zu einer erhöhten Synthese führen.  $TNF\alpha$  kann in 2 Formen vorliegen, membrangebunden oder frei im Serum (Goetz et al., 2004). Letzteres bindet an  $TNF\alpha$ -Rezeptoren und kann wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren ( $NF\kappa B$ ,  $AP-1=activation\ protein\ 1$ ), die beispielsweise eine synergistisch wirkende Zytokinproduktion (z.B. *Interleukin 1 = IL-1*) zur Folge haben.  $TNF\alpha$  bindet an zwei membrangebundene Rezeptoren, dem  $TNF-R1$  und dem  $TNF-R2$ . Nach heutiger Studienlage wird angenommen, dass dem  $TNF-R1$  eine bedeutendere Rolle für die Effektivität von  $TNF\alpha$  nach Trauma zukommt. Dieser ist auch mit verantwortlich für die kurze Halbwertszeit von  $TNF\alpha$  mit 14-18min. Eine vermehrte  $TNF\alpha$  mRNA-Expression konnte in unserer Studie in Monozyten polytraumatisierter Patienten nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich sogar eine signifikante Expressionsreduktion nach 6, 12, 24 und 48 Stunden. Möglicherweise besteht ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der reduzierten mRNA-Expression des Signaltransduktionsproteins  $TEC-PTK$ , welches in der Reaktionskaskade vor der  $TNF\alpha$ -Synthese steht, und der mRNA-Expression von  $TNF\alpha$  in Monozyten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Normalprobanden, die *in vitro* eine vermehrte  $TNF\alpha$  mRNA-Expression nach *LPS*-Stimulation erfahren. Unbekannte andere Faktoren müssen bei der Reduktion von  $TNF\alpha$  auf mRNA-Ebene in Monozyten beteiligt sein. Es gilt jedoch auch zu beachten, dass es sich um die mRNA-Expression in Monozyten handelt, welche nur eingeschränkt Rückschlüsse auf das letztendlich synthetisierte und im Serum vorhandene Protein zulässt, da andere Zelllinien ebenfalls an der  $TNF\alpha$ -Synthese beteiligt sind. Das in der

Literatur bereits beschriebene Housekeeping Gen *HPRT* mit konstanter mRNA-Expression (Pernas-Alonso et al., 1999) zeigte in unsere Studie nach Polytrauma in Monozyten eine signifikante mRNA-Expressionsreduktion bei Aufnahme in den Schockraum und 24h nach Trauma. Aufgrund dieser posttraumatischen Expressionsänderung wurde *HPRT* nicht als Housekeeping Gen zur Normalisierung der Patientenergebnisse herangezogen.

Die Zelllinie der Monozyten scheint eine Änderung der Protein- und Zytokinsynthese nach Trauma auf mRNA-Ebene zu erfahren. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass den Monozyten eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des posttraumatischen Multiorganversagens zukommt. Allerdings muss hier ergänzt werden, dass es sich bei den Ergebnissen um mRNA-Expressionen handelt und diese nicht proportional zu dem im Serum vorhandenen Protein sein müssen. Das Protein kann einerseits vermindert sein, weil die mRNA vor der Translation durch Enzyme abgebaut wurde. Andererseits kann das synthetisierte Protein überproportional vorliegen, da es auch von anderen Zelllinien synthetisiert werden kann oder einzelne mRNA-Stränge mehrfach abgelesen werden.

Darüber hinaus finden sich signifikante Unterschiede der mRNA-Expression, sowohl für *TEC-PTK* als auch *PMN-Elastase* in Monozyten bezüglich des Geschlechts und des Lebensalters. Im Vergleich zu männlichen Patienten wird die *TEC-PTK* mRNA 24 Stunden nach Trauma in Patientinnen signifikant reduziert exprimiert. 12 Stunden nach Trauma findet sich ebenfalls ein signifikanter, geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für die *PMN-Elastase*. Ebenfalls haben hier Patientinnen eine signifikant reduzierte mRNA-Expression. Es konnte ein altersspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* gezeigt werden. Dieser ist 12 Stunden nach Trauma signifikant reduziert für Patienten nach dem 40. Lebensjahr. In Normalprobanden ließ sich kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* nachweisen. Jedoch muss hier die geringe Fallzahl mit jeweils n=3 beachtet werden. Da alle freiwilligen

Probanden das 40. Lebensjahr nicht überschritten hatten, konnte ein altersspezifisches Korrelat in Normalprobanden nicht berechnet werden. Aus den Ergebnissen nach Trauma geht hervor, dass auch das Lebensalter auf die Regulation des Immunsystems Einfluss nimmt. Die *HPRT* mRNA-Expression in Granulozyten wird nicht durch Trauma beeinflusst. Zu allen Abnahmezeitpunkten nach Trauma konnte kein signifikanter mRNA-Expressionsunterschied im Vergleich zu der mRNA-Expression von *HPRT* im Gesunden nachgewiesen werden. *HPRT* ist hier expressionsstabil. Die *TEC-PTK* mRNA-Expression in Granulozyten war über den beobachteten Zeitraum zu keinem Zeitpunkt signifikant geändert, sie wurde stabil über die ersten 48h nach Trauma exprimiert. Es liegt keine signifikante mRNA-Expressionsänderung von *TEC-PTK* nach Trauma vor. Darüber hinaus liegt kein altersspezifischer oder geschlechtsspezifischer Unterschied vor. Auch die mRNA-Expression von *PMN-Elastase* war durch Trauma nicht signifikant verändert. Tendenziell ist eine Reduktion der mRNA-Expression im frühen posttraumatischen Verlauf erkennbar, jedoch ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied besteht nach Trauma für die mRNA-Expression von *PMN-Elastase* nicht. Lediglich ein signifikanter altersspezifischer mRNA-Expressionsunterschied konnte gezeigt werden. Im Vergleich zu den jüngeren Patienten fand sich 12 und 24 Stunden nach Trauma in Granulozyten der Patienten älter als 40 Jahre eine signifikante mRNA-Expressionsreduktion für *PMN-Elastase*. In der Zusammenschau der Ergebnisse in Granulozyten lässt sich schlussfolgern, dass zumindest der *PMN-Elastase* und der *TEC-PTK* in der Modulation der Immunreaktion keine tragende Rolle zugeschrieben werden kann. Des Weiteren gilt zu beachten, dass Granulozyten sehr empfindlich auf äußere Einflüsse reagieren. Es wäre denkbar, dass die Zellseparation beispielsweise die ursprüngliche Reaktionsfähigkeit der Granulozyten verändert und die realen Ergebnisse nach Trauma maskiert wurden.

Für alle Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass hier das Ereignis Trauma im Vordergrund stand und eventuelle Begleiterkrankungen und Medikamenteneinnahmen der Patienten nicht standardisiert werden konnten. In Monozyten konnte gezeigt werden, dass es für die untersuchten Proteine signifikante geschlechts- und altersspezifische mRNA-Expressionsänderungen nach Trauma gibt. Inwiefern ein unterschiedliches Risikoprofil hinsichtlich des Geschlechts und des Lebensalter besteht, kann anhand der kleinen Fallzahl nicht eindeutig geklärt werden und muss anhand größerer Fallzahlen beurteilt werden. Jedoch ist die Tendenz erkennbar, dass weibliches Geschlecht und höheres Lebensalter mit einer reduzierten mRNA-Synthesefähigkeit der untersuchten Gene einhergeht.

In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass bakteriellen Infektionen nach Trauma hinsichtlich der Entwicklung eines Multiorganversagens keine Schlüsselrolle zukommt, jedoch beeinflussen nosokomiale Infektionen den Verlauf ungünstig. Ebenso steigt das Risiko durch iatrogene Interventionen, Notfallchirurgische Eingriffe und die Gabe von Blutkonserven ein *SIRS* und *MOF* zu erleiden (Moore FA, 1997). Weitere Studien zeigten, dass genetische Polymorphismen für einige Zytokine, z.B. für *Il-6* oder *TNF $\alpha$* , Einfluss auf die Schwere eines posttraumatischen *SIRS* nehmen können (Hildebrand et al., 2005b). Es konnte in humanen Monozyten gezeigt werden, dass in Patienten, die im Rahmen eines posttraumatischen Multiorganversagens verstarben gegenüber den Überlebenden signifikant unterschiedliche Expressionsprofile für inflammatorische Proteine und Signaltransduktionsproteine nachweisbar waren (Biberthaler et al., 2005). In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Studie und den Ergebnissen vorangegangener Studien und Folgestudien wurde gezeigt, dass die Ausbildung eines posttraumatischen Multiorganversagens von einer Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Verletzungsmuster, Alter, Geschlecht und Genetik (Watanabe et al., 2005) abhängig ist. Die vorliegenden Ergebnisse erhärteten den Verdacht, dass den Monozyten eine tragende Rolle in der Induktion und Ausprägung eines *CARS* mit folgendem *MOF* zukommt.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Gefürchtete Komplikation nach Polytrauma ist die Entwicklung eines Multiorganversagens. Hierbei kommt es durch eine Dysregulation des Immunsystems zu einer überschießenden systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome = SIRS*) oder zu einer reduzierten, systemischen immunologischen Aktivität (*compensatory antiinflammatory response syndrome = CARS*). Beide Reaktionen können zu einem Multiorganversagen (*multiple organ failure = MOF*) führen. Bekannt ist, dass dem unspezifischen Immunsystem eine Schlüsselrolle zukommt. Die genauen molekularbiologischen Mechanismen und die dafür maßgeblich verantwortlichen Zelllinien sind allerdings bislang nicht endgültig aufgeklärt. Den Monozyten wird in der Literatur eine tragende Rolle in der Entwicklung eines Multiorganversagens zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden intrazelluläre Steuerungsmechanismen auf mRNA-Ebene in der frühen posttraumatischen Phase in Monozyten und Granulozyten mittels Real-Time PCR quantitativ untersucht. Die untersuchten Proteine wurden basierend auf Ergebnissen einer *Microarray-Studie* ausgewählt. Es wurde das Signaltransduktionsprotein *TEC-PTK*, die inflammatorisch wirksame *Protease PMN-Elastase*, das inflammatorisch wirksame Zytokin *TNF $\alpha$*  und *HPRT* als Housekeeping Gen untersucht. Ziel der vorliegenden Untersuchung war daher:

1. Kann für die beschriebenen Proteine in Monozyten und Granulozyten von gesunden Kontrollprobanden mit den etablierten Zellisolutions- und mRNA-Analyse-Methoden die mRNA-Expression quantitativ bestimmt werden, sowohl unter nativen Bedingungen als auch nach Stimulation mit *LPS*?
2. Sind signifikante quantitative mRNA-Expressionsänderungen dieser Proteine in Monozyten und Granulozyten polytraumatisierter Patienten im frühen posttraumatischen Beobachtungszeitraum von 48 Stunden erkennbar?

3. Lassen sich diese Veränderungen bestimmten klinischen Merkmalen, wie z.B. Geschlecht oder Alter des Patienten zuordnen?

Es wurden 19 polytraumatisierte Patienten mit einem *Injury Severity Score (ISS)*  $\geq 16$  Punkte eingeschlossen, die innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma in die Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität eingeliefert wurden. Die untersuchten Blutproben wurden direkt nach Trauma und dann standardisiert nach 6, 12, 24 und 48 Stunden entnommen. Die Monozyten und Granulozyten wurden *mittels positiver immunomagnetischer Zellseparation (MACS)* isoliert und die mRNA extrahiert. Die mRNA-Expression der untersuchten Proteine wurde mittels Real-Time PCR quantitativ nachgewiesen. Im Vergleich zu den nativen Ergebnissen konnte in Normalprobanden keine signifikante mRNA-Expressionsänderung in Monozyten für *HPRT*, *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* nach Stimulation mit *LPS* nachgewiesen werden. Lediglich für *TNF $\alpha$*  konnte eine signifikante mRNA-Expressionszunahme durch *LPS*-Stimulation gezeigt werden. In Granulozyten von Normalprobanden konnte im Vergleich zu den nativen Ergebnissen für *HPRT*, *TEC-PTK*, *PMN-Elastase* und *TNF $\alpha$*  keine signifikante mRNA-Expressionsänderung nach *LPS*-Stimulation nachgewiesen werden. Nach Trauma zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante mRNA-Expressionsreduktion bei Aufnahme [23 $\pm$ 7 Kopien vs. 60 $\pm$ 51 Kopien] und nach 48 Stunden [36 $\pm$ 9 Kopien vs. 60 $\pm$ 51] in Monozyten für *TEC-PTK*. Die mRNA-Expression der *PMN-Elastase* war in Monozyten bei Aufnahme [9 $\pm$ 0,4 Kopien vs. 79 $\pm$ 37 Kopien], nach 24 Stunden [11 $\pm$ 1 Kopien vs. 79 $\pm$ 37 Kopien] und nach 48 Stunden [9 $\pm$ 0,3 Kopien vs. 79 $\pm$ 37 Kopien] signifikant vermindert. Die *TNF $\alpha$*  mRNA-Expression war in Monozyten nach 6 Stunden [693 $\pm$ 221 Kopien vs. 2190 $\pm$ 687 Kopien], 12 Stunden [538 $\pm$ 253 Kopien vs. 2190 $\pm$ 687 Kopien], 24 Stunden [532 $\pm$ 124 Kopien vs. 2190 $\pm$ 687 Kopien] und 48 Stunden [331 $\pm$ 91 Kopien vs. 2190 $\pm$ 687 Kopien] signifikant vermindert exprimiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die *HPRT*-Expression in

Monozyten entgegen der bisherigen Literatur durch Trauma verändert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die *HPRT* mRNA bei Aufnahme [215±84 Kopien vs. 958±743 Kopien] und nach 24 Stunden [247±43 Kopien vs. 958±743 Kopien] signifikant vermindert exprimiert. Aufgrund dessen konnte *HPRT* als konstanter Parameter zur Normierung der Ergebnisse nicht herangezogen werden. In Granulozyten konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Trauma keine signifikante Expressionsänderung der untersuchten mRNA nachgewiesen werden. In Monozyten konnten nach Trauma signifikante geschlechtsspezifische und altersspezifische Expressionsänderungen für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* nachgewiesen werden. Im Vergleich zu männlichen Patienten wurde die *TEC-PTK* mRNA 24 Stunden nach Trauma in Patientinnen signifikant reduziert exprimiert. Die *PMN-Elastase* mRNA-Expression war 12 Stunden nach Trauma in Patientinnen signifikant reduziert. Bei Patienten nach dem 40. Lebensjahr war die mRNA 12 Stunden nach Trauma für *TEC-PTK* und *PMN-Elastase* signifikant reduziert exprimiert verglichen mit den jüngeren Patienten. Für Granulozyten zeigte sich lediglich ein signifikanter geschlechtsspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für *TEC-PTK* in Normalprobanden vor *LPS*-Stimulation. Ein signifikanter altersspezifischer mRNA-Expressionsunterschied für *PMN-Elastase* in Granulozyten war 12 Stunden und 24 Stunden nach Trauma nachweisbar.

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass inflammatorisch wirksame Proteine auf mRNA-Ebene in Monozyten im frühen posttraumatischen Verlauf signifikant reduziert exprimiert wurden. Darüber hinaus bestanden alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede der mRNA-Expression in Monozyten nach Trauma. In Granulozyten wurden keine signifikanten posttraumatischen Expressionsänderungen nachgewiesen. Es zeigten sich lediglich geschlechts- und altersabhängige Expressionsunterschiede. Die vorliegende Arbeit erhärtet den Verdacht, dass Monozyten eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung eines posttraumatischen Multiorganversagens tragen.



## **7. Literaturverzeichnis**

1. Angele M.K. & Faist E. (2002) Clinical review: immunodepression in the surgical patient an increased susceptibility to infection. *Crit. Care.* 6, 298-305.
2. Baker J.W., Deitch E.A., Li M., Berg R.D. & Specian R.D. (1988) Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J.Trauma.* 28, 896-906.
3. Bassoe C.F., Smith I., Sornes S., Halstensen A. & Lehmann A.K. (2000) Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods.* 21, 203-220.
4. Baue A.E., Durham R. & Faist E. (1998) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock.* 10, 79-89.
5. Biberthaler P., Neth P., Bach B., Mayer V., Mussack T., Mutschler W., Jochum M. (2003) Initial RNA expression in human monocytes after multiple injury: a pilot study on potentially trauma-sensitive factors by using the microarray-technique. *Eur. J. Med. Res.* 12; 8 (11): 473-84.
6. Biberthaler P., Stegmaier J., Mayer V., Kirchhoff C., Neth P., Mussack T., Mutschler W. & Jochum M. (2004b) Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock.* 22, 527-532.
7. Biberthaler P., Bogner V., Baker H.V., Lopez M.C., Neth P., Kanz K.G., Mutschler W., Jochum M., Moldawer L. (2005) Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock.* 24, 11-19.
8. Bone R.C. (1996) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med.* 125, 680-687.
9. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M. & Sibbald W.J. (1992) 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 the Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [see comments]. *Chest.* 101, 1644-1655
10. Botha A.J., Moore F.A., Moore E.E., Kim F.J., Banerjee A. & Peterson V.M. (1995a) Postinjury neutrophil priming and activations: an early vulnerable window. *Surgery.* 118, 358-364.
11. Botha A.J., Moore F.A., Moore E.E., Sauaia A., Banerjee A. & Peterson V.M. (1995b) Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J. Trauma.* 39, 411-417.
12. Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.

13. Cavaillon J.M., Adib-Conquy M., Cloez-Tayarani J. & Fitting C. (2001) Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review. *J. Endotoxin. Res.* 7, 85-93.
14. Ciesla D.J., Moore E.E., Johnson J.L., Burch M.J., Cothren C.C., Sauaia A. (2005) A 12 year prospective study of postinjury multiple organ failure. Has anything changed? *Arch. Surg.* 140, 432-440.
15. Cotter M.J., Norman K.E., Hellewell P.G. & Ridger V.C. (2001) A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am. J. Pathol.* 159, 473-481.
16. Curtsinger J.M., Schmidt C.S., Mondino A., Lins D.C., Kedl R.M., Jenkins M.K. & Mescher M.F. (1999) Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of native CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. *J. Immunol.* 162, 3256-3262.
17. Davies M.G. & Hagen P.O. (1997) Systemic inflammatory response syndrome. *Br. J. Surg.* 84, 920-935.
18. Deitch M.G. & Hagen P.O. (1997) Effect of stress and trauma on bacterial translocation from gut. *J. Surg. Res.* 42, 536-542.
19. Ertel W., Keel M., Bonaccio M., Steckholzer U., Gallati H., Kenney J.S. & Trentz O. (1995) Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J.Trauma.* 39, 879-885.
20. Ertel W., Keel M., Marty D., Hoop R., Safret A., Stocker R. & Trentz O. (1998) [Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]. *Unfallchirurg.* 101, 520-526.
21. Faist E., Kupper T.S., Baker C.C., Chaudry I.H., Dwyer J. & Baue A.E. (1986) Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch. Surg.* 121, 1000-1005.
22. Faist E., Schinkel C. & Zimmer S. (1996) Update on the mechanism of immune suppression of injury and immune modulation. *World. J. Surg.* 20, 454-459.
23. Faist E., Schinkel C., Zimmer S., Kremer J.P., von Donnersmarck G.H. & Schildberg F.W. (1993) Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling. *J.Trauma.* 34, 846-853.
24. Fosse E., Mollnes T.E., Aasen A.O., Trumpy J.H. & Stokke T. (1987) Complement activation following multiple injuries. *Acta. Chir. Scand.* 153, 325-330.
25. Gebhard F., Pfetsch H., Steinbach G., Strecker W., Kinzl L. & Bruckner U.B. (2000) Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Arch. Surg.* 135, 291-295.

26. Goetz F.W., Planas J.V. & Mackenzie S. (2004) Tumor necrosis factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 487-497.
27. Guha M. & Mackman N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85-94.
28. Gutteridge J.M. & Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 136-147.
29. Hassoun H.T., Kone B.C., Mercer D.W., Moody F.G., Weisbrodt N.W. & Moore F.A. (2001) Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock.* 15, 1-10.
30. Hauser C.J., Lagoo S., Lagoo A., Hale E., Hardy K.J., Barber W.H., Bass J.D. & Poole G.V. (1995) Tumor necrosis factor alpha gene expression in human peritoneal macrophages is suppressed by extra-abdominal trauma. *Arch.Surg.* 130, 1186-1191.
31. Hietbrink F., Koenderman L., Rijkers G.T., Leenen L. (2006) Trauma: The role of the innate immune system. *Review. World. Emerg. Surg.* 20, 1-15.
32. Hildebrand F., Pape H.C., Krettek C. (2005a) : The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction. *Unfallchirurg.* 108; 793-803.
33. Hildebrand F., Pape H.C., van Griensven M., Meier S., Hasenkamp S., Krettek C., Stuhmann M. (2005b) Genetic predisposition for a compromised immune system after multiple trauma. *Shock.* 24, 518-522.
34. Hill J., Lindsay T.F., Ortiz F., Yeh C.G., Hechtman H.B. & Moore F.D.Jr. (1992) Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J. Immunol.* 149, 1723-1728.
35. Hoch R.C., Rodriguez R., Manning T., Bishop M., Mead P., Shoemaker W.C. & Abraham E. (1993) Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit. Care. Med.* 21, 839-845.
36. Huang Y.S., Yang Z.C., Liu X.S., Chen F.M., He B.B., Li A. & Crowther R.S. (1998) Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns.* 24, 706-716.
37. Jordan M.S., Singer A.L. & Koretzky G.A. (2003) Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat. Immunol.* 4, 110-116.
38. Kanehisa M. (2001) Prediction of higher order functional networks from genomic data. *Pharmacogenetics.* 2, 373-385.
39. Keel M., Ecknauer E., Stocker R., Ungethüm U., Steckholzer U., Kenney J., Gallati H., Trentz O. & Ertel W. (1996) Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and antiinflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J. Trauma.* 40, 907-912.

40. Keel M., Trentz O. (2005) Pathophysiology of polytrauma. Review. *Injury*. 36, 691-709.
41. Kell M.R., Kavanaugh E.G., Goebel A., Soberg C.C. & Lederer J.A. (1999) Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock*. 12, 139-144.
42. Kelly J.L., O'Sullivan C., O'Riordain D., Lyons A., Doherty J., Mannick J.A. & Rodrick M.L. (1997) Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann. Surg.* 225, 530-541.
43. Khreiss T., Jozsef L., Chan J.S. & Filep J.G. (2004) Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell. Signal*. 16, 801-810.
44. Kirsch M. & de Groot H. (1999) Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 274, 24664-24670.
45. Korkmaz B., Poutrain P., Hazouard E., de Monte M., Attucci S. & Gauthier F.L. (2005) Competition between elastase and related protease from human neutrophil for binding to alpha1-protease inhibitor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 32, 553-9.
46. Kriegelstein C.F. & Granger D.N. (2001) Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am. J. Hypertens.* 14, 44S-54S.
47. Laudanski K., Miller-Graziano C., Xiao W., Mindrinos M.N., Richards D.R., De A., Moldawer L.L., Maier R.V., Bankey P., Baker H.V., Brownstein B.H., Cobb J.P., Calvano S.E., Davis R.W., Tompkins R.G. and Inflammation and Host Response to Injury Large-Scale Collaborative Research Program (2006) Cell-specific expression and pathway analyses reveal alterations in trauma-related human T cell and monocyte pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(42):15564-9
48. Lefering R. Goris R.J., van Nieuwenhoven E.J. & Neugebauer E. (2002) Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch.Surg.* 387, 14-20.
49. Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568.
50. Mack V.E., McCarter M.D., Naama H.A., Calvano S.E. & Daly J.M. (1996) Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch. Surg.* 131, 1303-1308.
51. Majetschak M., Borgermann J., Waydhas C., Obertacke U., Nast-Kolb D. & Schade F.U. (2000) Whole blood tumor necrosis factor-alpha production and its relation to systemic concentrations of interleukin 4, interleukin 10, and transforming growth factor-beta 1 in multiply injured blunt trauma victims. *Crit. Care. Med.* 28, 1847-1853
52. Majetschak M., Flohe S., Obertacke U., Schroder J., Staubach K., Nast-Kolb D., Schade F.U. & Stuber F. (1999) Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann. Surg.* 230, 207-214.

53. Mannick J.A., Rodrick M.L. & Lederer J.A. (2001) The immunologic response to injury. *J. Am. Coll. Surg.* 193, 237-244.
54. Mano H. (1999) Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10, 267-280.
55. Massberg S. & Messmer K. (1998) The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 30, 4217-4223
56. Matsukawa A., Kaplan M.H., Hogaboam C.M., Lukacs N.W. & Kunkel S.L. (2001) Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and (Stat)6 in the innate immune response during sepsis. *J. Exp. Med.* 193, 679-688.
57. McDonald P.P., Bald A. & Cassatella M.A. (1997) Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in the human neutrophils. *Blood.* 89, 3421-3433.
58. Menger M.D., Pelikan S., Steiner D. & Messmer K. (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am. J. Physiol.* 263, H1901-H1906.
59. Miyaoka K., Iwase M., Suzuki R., Kondo G., Watanabe H., Ito D. & Nagumo M. (2005) Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation. *J. Surg. Res.* 125: 144-150.
60. Moore E.E., Moore F.A., Harken A.H., Johnson J.L., Ciesla D. & Banerjee A. (2005) The two-event construct of postinjury multiple organ failure. *Shock.* 24,71-74.
61. Moore F.A., Moore E.E., Poggetti R., McAnena O.J., Peterson V.M., Abernathy C.M. & Parsons P.E., (1991) Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J. Trauma.* 31, 629-636.
62. Moore F.A., Sauaia A., Moore E.E., Haenel J.B., Burch J.M. & Lezotte D.C. (1996) Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J. Trauma.* 40, 501-510.
63. Moraes T.J., Chow C.W. & Downey G..P. (2003) Proteases and lung injury. *Crit. Care. Med.* 31, S189-S194.
64. Mueller J.M., Rupec R.A. & Baeuerle P.A. (1997) Study of gene regulation by NF-kappaB and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods.* 11, 301-312.
65. Nast-Kolb D., Aufmkolk M., Ruchholtz S., Obertacke U. & Waydhas C. (2001) Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J. Trauma.* 51, 835-841.
66. Nast-Kolb D., Waydhas C., Gippner-Steppert C., Schneider I., Trupka A., Ruchholtz S., Zettl R., Schweiberer L. & Jochum M. (1997) Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J. Trauma.* 42, 446-454.

67. Neidhardt R., Keel M., Steckholzer U., Safret A., Ungethuen U., Trentz, O. & Ertel, W. (1997) Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients. *J. Trauma.* 42, 863-870.
68. Nishibori M., Takahashi H.K. & Mori S. (2003) The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 7-12.
69. Oberholzer A., Souza S.M., Tschoeke S.K., Oberholzer C., Abouhamze A., Pribble J.P., Moldawer L.L. (2005) Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock.* 23, 488-493.
70. Pape H.C., van Griensven M., Rice J., Gansslen A., Hildebrand F., Zech S., Winny M., Lichtinghagen R. & Krettek C. (2001) Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. *J. Trauma.* 50, 989-1000.
71. Pellegrini J.D., De A.K., Kodys K., Puyana J.C., Furse R.K. & Miller-Graziano C. (2000) Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma. *J. Surg. Res.* 88, 200-206.
72. Pernas-Alonso R., Morelli F., di Porzio U. & Perrone-Cappano C. (1999) Multiplex semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain. Res. Protoc.* 4, 395-406.
73. Pittet D., Rangel-Frausto S., Li N., Tarara D., Costigan M., Rempe L., Jebson P. & Wenzel R.P. (1995) Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med.* 21, 302-309.
74. Rabb H. (2002) The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. *Kidney Int.* 61, 1935-1946.
75. Rabinovici R., John R., Esser K.M., Vernick J. & Feuerstein G. (1993) Serum tumor necrosis factor-alpha profile in trauma patients. *J. Trauma.* 35, 698-702.
76. Rebulli P., Porretti L., Bertolini F., Marangoni F., Prati D., Smacchia C., Pappalettera M., Parravicini A. & Sirchia G. (1993) White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. *Transfusion.* 33, 128-133.
77. Remick D.G., Bolgos G., Copeland S., Siddiqui J. (2005) Role of interleukin-6 in mortality from physiologic response to sepsis. *Infect. Immun.* Vol 73, 2751-2757.
78. Ruchholtz S., Nast-Kolb D., Waydhas C. & Lefering R. (1997) [The trauma register of the 'Polytrauma' Committee of the German Society of Trauma Surgery as the basis for quality management in the management of severely injured patients]. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* 114, 1265-1267.

79. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E., Moser K.S., Brennan R., Read R.A. & Pons P.T. (1995) Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J. Trauma.* 38, 185-193.
80. Schinkel C., Licht K., Zedler S., Schinkel S., Fraunberger P., Fuchs D., Neugebauer E., Kreuzer E. & Faist E. (2001b) Interferon-gamma modifies cytokine release in vitro by monocytes from surgical patients. *J.Trauma.* 50,321-327.
81. Schinkel C., Sendtner R., Zimmer S. & Faist E. (1998) Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. *J.Trauma.* 44, 743-748.
82. Schmidt U., Boucheron N., Unger B. & Ellmeier W. (2004b) The role of Tec family kinases in myeloid cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 65-78.
83. Stahel P.F., Heyde C.E., Wyrwich W., Ertel W. (2005) Current concepts of polytrauma management: from ATLS to „damage control“. *Orthopäde.* 34, 823-836.
84. Stegmaier J., Kirchhoff C., Kanz KG., Mayer V., Landes J., Euler E., Mutschler W., Biberthaler P. (2006) Analysis of NF-kB nuclear translocation in PMN-neutrophils of major trauma patients in the early post-traumatic period: A pilot study. *World J. Surg.* 30, 2142-51.
85. Svoboda P., Kantorova I. & Ochmann J. (1994) Dynamics of interleukin 1,2 and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J. Trauma.* 36, 336-340.
86. Tscherne H., Trentz O., Sturm J. (1986) Mehrfachverletzungen. In: Heberer G, Köle, Tscherne H, editors. *Lehrbuch der Chirurgie.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1986: 720-725.
87. van der Poll.T., Marchant A., Buurman W.A., Berman L., Keogh C.V., Lazarus D.D., Nguyen L., Goldman M., Moldawer L.L. & Lowry S.F. (1995) Endogenous Il-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J. Immunol.* 155, 5397-401.
88. Walsh D.S., Siritongtaworn P., Pattanapanyasat K., Thavichaingarn P., Kongcharoen P., Jiarakul N., Tongtawe P., Yongvanitchit K., Komoltri C., Dheeradhada C., Pearce F.C., Wiesmann W.P. & Webster H.K. (2000) Lymphocyte activation after non-thermal trauma. *Br. J.Surg.* 87, 223-230.
89. Wang X., Zhao H. & Andersson R. (2004) Proteomics and leukocytes: an approach to understanding potential molecular mechanism of inflammatory responses. *J. Proteome Res.* 3, 921-929.
90. Watanabe E., Hirasawa H., Oda S., Matsuda K., Hatano M., Tokuhisa T., (2005) Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit. Care Med.* 33, 89-97.
91. Waydhas C. & Nast-Kolb D. (1998) Scores in polytrauma - do they help? *Langenbecks Arch. Surg.* 383, 209-213.

92. Weiser M.R., Williams J.P., Moore F.D., Jr. Kobzik L., Ma M., Hechtman H.B. & Carroll M.C. (1996) Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J. Exp. Med.* 183, 2343-2348.
93. Zahler S., Kowalski C., Brosig A., Kupatt C., Becker B.F. & Gerlach E. (1997) The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J. Immunol. Methods.* 200, 173-179.
94. Zedler S., Bone R.C., Baue A.E., von Donnersmarck G.H. & Faist E. (1999) T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit. Care Med.* 27, 66-72.
95. Zong Q., Schummer M., Hood L. & Morris D.R. (1999) Messenger RNA translation state: the second dimension of high-throughput expression screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10632-10636.



## **8. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN**

$\alpha$ 1-PI	alpha1-Protease Inhibitor
AP-1	Activation protein 1
CARS	Compensatory antiinflammatory response syndrome
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamino-tetra-acetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
HPRT	Hypoxanthinephosphoribosyltransferase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IRS	Ischämie-Reperfusion-Syndrom
LAT	Linker of activated T-cells
LEI	Leukozyten-Endothel Interaktion
KCl	Kaliumchlorid
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumbikarbonat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MACS	Magnetic-activated cell sorter
MHC I	Major histocompatibility complex I
MHC II	Major histocompatibility complex II
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
mRNA	messengerRibonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAF	Platelet adhesion factor
PBS	Phosphat buffered saline
PGE 2	Prostaglandin E2
PMN-Elastase	Polymorphnukleare-Elastase
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
SHT	Schädelhirntrauma
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TEC-PTK	Protein Tyrosin Kinase
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TNF-RI	Tumor Necrosis Factor – Receptor I
TNF-RII	Tumor Necrosis Factor– Receptor II

## 9. MATERIALIEN

### 9.1 Geräte und Material

Blutabnehmeröhrchen EDTA	Sarstedt
Blutabnehmeröhrchen Li-Heparin	Sarstedt
Blutabnehmeröhrchen Serum-Gel	Sarstedt
Elektrophoresekammern, horizontal	OWL
Eppendorf Reaktionsgefäße, Safe-lock für den LightCycler <sup>TM</sup>	Eppendorf
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr
Gefrierschrank, -80°C	Liebherr
Handschuhe	Sempermed
Heizblock	Hybaid
Kapillaren für den LightCycler <sup>TM</sup>	Roche
Kühlschränke	Liebherr
Mikropipetten	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Siemens
Neubauerzählkammer	Superior
pH-Meter	Inolab
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000µl)	Biozym
Spannungsgerät	Consort
Spritzen 5ml	Sarstedt
Spritzennadeln	Sarstedt
Temperaturzyklusautomaten <i>LightCycler<sup>TM</sup></i>	Roche
Vortexer	VM4 CAT
Zentrifugen	Jouan/ Eppendorf
Zentrifugenadapter (Kühlblock)	Roche
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Falcon (Heidelberg, Deutschland)

## 9.2. Chemikalien

1x TAE	Invitrogen
Beta-Mercaptoethanol	
Bluejuice Farbmarker	Invitrogen
CD14-Antikörper	Miltenyi
CD15-Antikörper	Miltenyi
cDNA-Kit	Roche
DNS Ladder 100bp und 250bp	Invitrogen
EDTA (Ethylen-diamino-tetra-acetat)	
Erylyse Puffer	
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 5%	Merck
H <sub>2</sub> O PCR-grade	Roche
HPRT- Primer	Research-LC
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Roche
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	
PMN-Elastase-Primer	Research-LC
Polymerasen	Roche
Reverse Transkriptase	Roche
RLT-Puffer	Qiagen
RNA-Kit	RNeasy midi kit (Qiagen)
TEC-PTK-Primer	Research-LC
TNF $\alpha$ -Primer	Research-LC

## **10. DANKSAGUNG**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, bedanken für die Überlassung des Themas, das Bereitstellen der Mittel, sowie die umfassende Unterstützung.

Weiter möchte ich mich bei der Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie, Frau Prof. Dr. Marianne Jochum für ihre Unterstützung und Beratung sehr bedanken.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. Peter Biberthaler, der mir dieses Projekt anvertraut hat. Stets war er immer für Fragen, Anregungen, Diskussionen und Verbesserungsvorschläge da. Vielen Dank für die lehrreichen Jahre, die allumfassende Betreuung, der stets positiven Kritik und vor allem für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken ohne die diese Arbeit ebenfalls nie zustande gekommen wäre:

-AG Polytrauma: Danke für die sehr gute Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und vor allem Euren Esprit und Humor. Ohne Euch wären die vielen Stunden im Labor nur halb so schön gewesen.

-Claudia Geißler: Danke für die technische Unterstützung!

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern danken, für ihren Glauben an mich, ihre Unterstützung und für alles, was sie mir ermöglicht haben.

## 11. LEBENSLAUF

Verena Mayer  
Kaiserplatz 6  
80803 München

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geburtsdatum 16. Mai 1978 in Stuttgart

Familienstand ledig

Konfession evangelisch

### SCHULBILDUNG

---

09/84 - 06/88 Oskar-Schwenk-Grundschule, Waldenbuch

09/88 - 06/97 Philipp-Matthäus-Hahn Gymnasium, Leinfelden-Echterdingen

### STUDIUM

---

11/97 – 12/04 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

03/00 Physikum

03/01 1. Staatsexamen

03/03 2. Staatsexamen

12/04 3. Staatsexamen

### PRAKTISCHES JAHR

---

08/03 - 11/03 CHIRURGIE

Churchill Hospital, Oxford University School, UK  
Transplantationseinheit

Chirurgische Klinik und Poliklinik der LMU  
Innenstadt, München  
Viszeralchirurgie, Traumatologie und Notaufnahme

12/03 - 03/04 INNERE MEDIZIN

Medizinische Klinik und Poliklinik II Großhadern LMU, München  
Gastroenterologie und Hepatologie

Royal North Shore Hospital, University of Sydney, Australia  
Hämatologie und Kardiologie

04/04 - 07/04 DERMATOLOGIE

Dermatologische Klinik der LMU München, Tagesklinik und Ambulanz

#### KLINISCHE TÄTIGKEIT

---

04/05 – 08/07 Assistenzärztin, Medizinische Poliklinik des Klinikums Innenstadt, LMU  
München

seit 09/07 Assistenzärztin, Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern, LMU