

# **Immunmodulation in der Lunge nach stumpfem Weichteiltrauma**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. vet. med.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eva E. Bill

Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere - Chirurgie  
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. hc. Martin Kramer

**und**

Klinik für Unfallchirurgie, AG Chirurgische Forschung  
Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg- Essen

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Stefanie B. Flohé

**Immunmodulation in der Lunge nach  
stumpfem Weichteiltrauma**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. vet. med.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Eingereicht von

**Eva E. Bill**

Tierärztin aus St. Wendel

Gießen 2014

**Imprimatur**



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

---

Gutachter:

---

---

Tag der Disputation:

---

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen, die ich in der Dissertation angegeben habe, angefertigt. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen, habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Saarbrücken, 08.03.2014

---

Eva E. Bill

# INHALT

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
2.1 DAS IMMUNSYSTEM – EIN ÜBERBLICK.....	3
2.1.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i> .....	4
2.1.1.1 Lösliche Faktoren.....	5
2.1.1.2 Zelluläre Komponenten.....	6
2.1.1.3 Granulozyten.....	11
2.1.2 <i>Das adaptive Immunsystem</i> .....	15
2.1.2.1 B- Lymphozyten.....	15
2.1.2.2 T- Lymphozyten.....	17
2.2 IMMUNABWEHR IN DER LUNGE.....	19
2.3 IMMUNMODULATION NACH TRAUMA.....	22
2.3.1 <i>Pseudomonas- Infektion und Trauma</i> .....	24
2.3.2 <i>ARDS/ ALI</i> .....	26
2.4 ZIELE DER ARBEIT.....	29
<b>3 MATERIAL</b> .....	<b>32</b>
3.1 VERBRAUCHSMATERIAL.....	32
3.2 LABOR- GERÄTE.....	32
3.3 CHEMIKALIEN.....	32
3.4 PUFFER, LÖSUNGEN.....	33
3.5 REAGENZIEN, ZYTOKINE, STIMULI UND BAKTERIEN.....	34
3.5.1 <i>Reagenzien, Zytokine und Stimuli</i> .....	34
3.5.2 <i>Bakterien</i> .....	34
3.6 SEREN UND MEDIEN.....	35
3.6.1 <i>Seren</i> .....	35
3.6.2 <i>Kulturmedium</i> .....	35
3.7 ANTIKÖRPER.....	36

3.7.1	<i>Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse</i>	36
3.7.2	<i>Antikörper zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen</i>	37
3.8	VERSUCHSTIERE	37
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>39</b>
4.1	TIERMODELL ZUR INDUKTION EINES WEICHTEILTRAUMAS BEI DER MAUS	39
4.2	APPLIKATIONEN, BLUT- UND ORGANENTNAHME	40
4.2.1	<i>Applikationsarten</i>	40
4.2.2	<i>Blutentnahme</i>	41
4.2.3	<i>Organentnahme</i>	42
4.2.3.1	<i>Präparation der Milz</i>	42
4.2.3.2	<i>Präparation der Muskeln</i>	43
4.2.3.3	<i>Präparation der Lunge</i>	43
4.2.3.4	<i>Präparation der Lymphknoten</i>	43
4.3	ZELLKULTUR	44
4.3.1	<i>Erythrozyten- Lyse</i>	44
4.3.2	<i>Isolierung und Kultivierung von Milzzellen</i>	45
4.3.3	<i>Isolierung und Kultivierung von Muskelzellen</i>	46
4.3.4	<i>Isolierung und Kultivierung von Lungenzellen</i>	46
4.3.5	<i>Isolierung von Lymphknotenzellen</i>	47
4.3.6	<i>Bestimmung der Gesamtzellzahl</i>	48
4.4	KOMMERZIELLE STANDARDTESTVERFAHREN	48
4.4.1	<i>fluorescence activated cell sorting (FACS)</i>	48
4.4.1.1	<i>Prinzip</i>	48
4.4.1.2	<i>Färbung von Oberflächenmolekülen</i>	51
4.4.1.3	<i>Intrazelluläre Färbung</i>	51
4.4.1.4	<i>Detektion von reactive oxygen species (ROS)</i>	52
4.4.2	<i>enzyme- linked immunosorbant assay (ELISA)</i>	53
4.4.2.1	<i>Prinzip</i>	53
4.4.2.2	<i>Durchführung</i>	54
4.5	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	55
4.5.1	<i>Charakterisierung der immunologischen Zellzusammensetzung der Lunge nach Trauma</i>	55

4.5.2 Einfluss löslicher Komponenten auf Granulozytenrekrutierung in die Lunge nach Weichteiltrauma.....	56
4.5.3 Auswirkung einer bakteriellen Infektion nach Trauma auf die Granulozyteninfiltration in die Lunge	57
4.6 STATISTISCHE ANALYSEN.....	58
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>60</b>
5.1 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLULÄREN IMMUNMODULATION NACH TRAUMA.....	60
5.1.1 Modulation der Granulozytenanzahl nach Weichteiltrauma.....	60
5.1.1.1 Granulozyten in der Lunge.....	60
5.1.1.2 Granulozyten ausserhalb der Lunge.....	63
5.1.2 weitere Immunzellen in der Lunge nach Trauma.....	65
5.1.2.1 Monozyten und Makrophagen .....	65
5.1.2.2 NKT-, CD3 <sup>+</sup> - und NK- Zellen.....	67
5.1.2.3 Dendritische Zellen .....	69
5.1.3 Modulation der Granulozytenzahl nach Trauma in TLR4 <sup>-/-</sup> , TLR2,4 <sup>-/-</sup> und MyD88 <sup>-/-</sup> - Mäusen ...	70
5.1.3.1 TLR4 <sup>-/-</sup> , TLR2,4 <sup>-/-</sup> .....	70
5.1.3.2 MyD88 <sup>-/-</sup> .....	71
5.2 GRANULOZYTENINFILTRATION, ROS UND S100.....	73
5.2.1 ROS.....	73
5.2.2 S100A8/ S100A9 .....	74
5.3 GRANULOZYTENINFILTRATION UND SERUMTRANSFER .....	75
5.4 CHARAKTERISIERUNG DER IMMUNMODULATION IN DER LUNGE NACH TRAUMA IM LUNGENINFEKTIONSMODELL .....	77
5.4.1 Modulation der Granulozytenzahl nach Trauma im Infektionsmodell .....	78
5.4.2 Zusammensetzung weiterer Immunzellen in der Lunge nach Trauma im Infektionsmodell .....	81
5.4.2.1 Monozyten und Makrophagen .....	81
5.4.2.2 NKT-, CD3 <sup>+</sup> - T- und NK- Zellen .....	83
5.4.2.1 Dendritische Zellen .....	85
5.5 TRAUMA, GRANULOZYTENREKRUTIERUNG UND INFEKTABWEHR .....	86
5.5.1 Chemotaktische Faktoren KC und MIP- 2 .....	87
5.5.2 Infektabwehr der Lunge nach Trauma.....	87
5.5.2.1 Zytokinmuster in der Lunge nach Trauma und <i>in vitro</i> Restimulation mit <i>P. aeruginosa</i> .....	87

5.5.2.2	Trauma, <i>P. aeruginosa</i> - Infektion <i>in vivo</i> und ROS.....	89
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
6.1	GRANULOZYTENINFILTRATION NACH WEICHTEILTRAUMA .....	92
6.1.1	<i>Zeitlich abhängige Granulozytenrekrutierung in die Lunge nach Trauma .....</i>	<i>95</i>
6.1.1.1	Unreife Granulozyten infiltrieren die Lunge nach Trauma .....	97
6.1.2	<i>Weitere Granulozytenrekrutierung infolge sekundärer Pseudomonas- Infektion.....</i>	<i>99</i>
6.2	EINFLUSS VON MYD88- SOWIE TLR4 AUF DIE GRANULOZYTENREKRUTIERUNG IN DIE LUNGE NACH TRAUMA.....	100
6.3	TRAUMATISCH BEDINGTE VERÄNDERUNGEN AUF MOLEKULARER UND ZELLULÄRER EBENE .....	104
6.3.1	<i>Serum als Kommunikationsmedium zur Granulozytenrekrutierung nach Trauma.....</i>	<i>104</i>
6.3.2	<i>IL- 6, KC und MIP- 2: Beteiligung an Lungeninflammation nach Weichteiltrauma .....</i>	<i>105</i>
6.3.3	<i>IL- 10 und IFN- <math>\gamma</math> Komponenten der Infektabwehr nach Weichteiltrauma .....</i>	<i>108</i>
6.4	RELEVANZ MURINER TRAUMAMODELL FÜR DIE PRÄVENTIONSMEDIZIN.....	111
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>153</b>
10.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	153
10.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	156

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

**A**

Abb.	Abbildung
AECC	amerikanischen- europäischen Konsenskonferenz
AM	Alveolar Makrophagen
ALI	<i>acute lung injury</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APCs	<i>antigen presenting cells</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>

**B**

BCR	<i>B- cell receptor</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>

**C**

ca.	zirka
CARS	<i>compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
CCL	$\beta$ - Chemokine
CCR	Chemokinrezeptor für $\beta$ - Chemokine
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Lymphozytendifferenzierungsgruppe)
CFSE	Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester
CFU	<i>Colony- forming units</i>
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
ConA	Concanavalin A
CpG	Cytosin- phosphatidyl- Guanosin
CXC	$\alpha$ - Chemokine
CXCR	Chemokinrezeptor für $\alpha$ - Chemokine
Cy	Cyanin

**D**

DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DCs	<i>dendritic cells</i> (dendritische Zellen)
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

**E**

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch

**F**

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötale Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz- Kanäle
FOX	<i>forkhead box</i>
FSC	<i>forward- scattered</i> (Vorwärtsstreulicht)

**G**

G Gauge  
 GM- CSF *granulocyte- macrophage colony- stimulating facor*  
 gr. griechisch

**H**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wasserstoffperoxid  
 HEPES N- (2- Hydroxyethyl)- Piperazin- N'- 2- Ethansulfonsäure  
 HMGB1 *high mobility group box 1*  
 HRP Streptavidin- *Horseradish* (Meerrettich) Peroxidase  
 HSC *haematopoetic steam cells*  
 HSP *heat shock protein* (Hitze- Schock- Protein)

**I**

ICAM- 1 *intracellular adhesions molecule- 1*  
 iDC *immature DCs*  
 IFN Interferon  
 Ig Immunglobulin  
 IL Interleukin  
 i.m. intramuskulär  
 i.n. intranasal  
 i.p. intraperitoenal  
 iT<sub>reg</sub> induzierte T<sub>reg</sub>  
 i.v. intravenös

**K**

K Kontrollgruppe  
 K+ P.a. Kontrollgruppe mit P. aeruginosa - Infektion  
 KC *keratinocyte derived chemokine*  
 KCl Kaliumchlorid  
 KO *knockout*

**L**

lat. latein  
 Lnn. Lymphknoten  
 LNC *lymph node cells* (Lymphknotenzellen)  
 LPS Lipopolysaccharid

**M**

M. *Musculus*  
 MACS *magnetic cell sorting*  
 MAL *myeloid adaptor -like protein*  
 MAPK *Mitogen- aktivierte- Protein- Kinase*  
 MCP *monocyte chemotactic protein*  
 MFI *mean fluoescence intensity*  
 MHC *major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)  
 MIP *macrophage inflammatory protein*  
 MOF *multi organ failure* (Multiorganversagen)  
 MyD88 *myeloid differentiation primary- response protein 88*

**N**

NaCl Natriumchlorid  
 NADPH Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat  
 NET *neutrophil extracellular trap*  
 NF- κB *nuclearfactor- kappa B*

NK- Zelle Natürliche Killerzelle  
 NKT- Zelle Neutrale Killer- T- Zellen  
 NO Stickstoffmonoxid

**O**

O<sub>2</sub><sup>-</sup> Hyperoxidanion  
 OVA Ovalbumin-Protein

**P**

P.a. *Pseudomas aeruginosa*  
 PAF *platelet- activating factor*  
 PAMP *pathogen associated molecular pattern*  
 PBS *phosphat-buffered saline*  
 PECAM- 1 *platelet endothelial cell adhesions molecule- 1*  
 PCO<sub>2</sub> *Partialdruck des Kohlendioxid (Blutkohlendioxid)*  
 PE *Phycoerythrin*  
 PECy7 *Phycoerythrin konjugiert mit Cy7*  
 PEEP *positive end- expiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck)*  
 PerCP *Peridinin-Chlorophyll-Protein*  
 PerCPCy5.5 *Peridinin-Chlorophyll-Protein konjugiert mit Cy5.5*  
 PGE<sub>2</sub> *Prostaglandin E<sub>2</sub>*  
 PMA *Phorbol-12-Myristat-13-Acetat*  
 PMN *polymorph nuclear granulocytes*  
 PRR *pathogen or pattern recognition receptor*

**R**

R 123 Rhodamin 123  
 RNA *ribo nucleic acid (Ribonukleinsäure)*  
 ROS *reactive oxigen species*  
 rpm *rounds per minute*  
 RPMI Roswell Park Memorial Institute Medium 1640  
 RT Raumtemperatur

**S**

s. siehe  
 SAV Streptavidin  
 SIRS *systemic inflammatory response syndrome*  
 SSC *side- scattered (Seitwärtsstreulicht)*

**T**

T Traumagruppe  
 T+ P.a. Traumagruppe mit P. aeruginosa - Infektion  
 Tab. Tabelle  
 TCR *t- cell receptor*  
 TGF *transforming growth factor*  
 T<sub>H</sub> T- Helfer- Zelle  
 T<sub>H</sub>1/ 2/ 17 T- Helfer- Zelle des Typus 1/ 2/ 17  
 TIRAP *TIR- domain- containing adapter protein*  
 TLR *toll- like receptor*  
 TMB Tetramethylbenzidin  
 TNF *tumor necrosis factor*  
 TRAIL *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*  
 TRIF *TIR- domain- containing adaptor inducing IFN- β*  
 TRAM *TRIF- related adaptor molecules*  
 TSA *triptic soy agar*

TSB	<i>triptic soy broth</i>
TSC	<i>total spleen cells</i>
T <sub>reg</sub>	regulatorische T- Zelle
Tween- 20	Polyoxyethylen- (20)- Sorbitanmonolaurat

**U**

UV	Ultraviolett- Strahlung
----	-------------------------

**V**

VCAM-1	<i>vascular cell adhesions molecule- 1</i>
v/ v	<i>by volume</i>
VLE	<i>very low endotoxin</i>
VLP	<i>viral- like particles</i>

**W**

WT	Wildtyp
----	---------

**Z**

ZTL	Zentrales Tierlaboratorium
-----	----------------------------

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt.

## 1 EINLEITUNG

---

Traumata verschiedener Genese führen zu Veränderungen im Immunsystem von Mensch und Tier, die in schweren Fällen zu Multiorganversagen und Tod führen können. Auch extrapulmonal lokalisierte Traumata leiten dabei häufig eine Immunmodulation ein, die sich über z.T. noch unbekannte Umstände auf die Lunge ausweiteten und dort durch Inflammation ein *acute respiratory distress syndrome* auslösen kann. Gleichzeitig erhöht sich die Infektanfälligkeit des gesamten Organismus aufgrund der gleichzeitig eintretenden Immunsuppression. Die Pathologie dieses Geschehen ist noch nicht vollständig verstanden, hat jedoch beträchtliche Konsequenzen in der Human- wie der Tiermedizin wegen der daraus entstehenden möglichen sehr ernstesten Komplikationen bei der Behandlung von Patienten nach schweren Verletzungen oder nach großen Operationen.

Es gibt verschiedene *in vivo* Tierversuchsmodelle zum *acute respiratory distress syndrome*, wie z.B. Untersuchungen zur Wirkung von mesenterialer Ischämie/ Reperfusion, Hämorrhagischem Schock, Knochenfraktur, Trauma des Hinterbeins durch Explosion („blast trauma“), Verbrennung, experimentelle Pankreatitis oder Kombination einzelner Traumata als Polytrauma. Die entsprechenden Untersuchungen beschäftigen sich speziell mit der immunologischen Veränderungen in der Lunge nach Traumatisierung. Allerdings gibt es dabei zu bedenken, dass jedes einzelne Traumageschehen eine spezifische Immunmodulation zur Folge hat.

Vor dieser Arbeit war bekannt dass insbesondere Skelettmuskeltraumata die Einwanderung von Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen in den traumatisierten Muskel induzieren und in einer Verschiebung der lokalen Homöostase resultieren bis hin zu einer Immunsuppression im drainierenden Lymphknoten. Die beobachteten Mechanismen gaben Anlass zur Vermutung dass auch weitere Zell- sowie Organsysteme von der Immunmodulation nach stumpfem Weichteiltrauma betroffen sein könnten. In dieser Arbeit werden in erster Linie die immunologischen Veränderungen in der Lunge und dem Blut von Mäusen nach Weichteiltrauma auf den Wadenmuskel untersucht. Besonders der zelluläre Status und die inflammatorische sowie antiinflammatorische Zytokinbeteiligung werden überprüft. Im Infektionsmodell wird zudem der Einfluss einer Sekundärinfektion mit

dem typischen Hospitalismuskeim *Pseudomonas aeruginosa* auf das Immunsystem der Lunge nach Skelettmuskeltrauma ermittelt.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

---

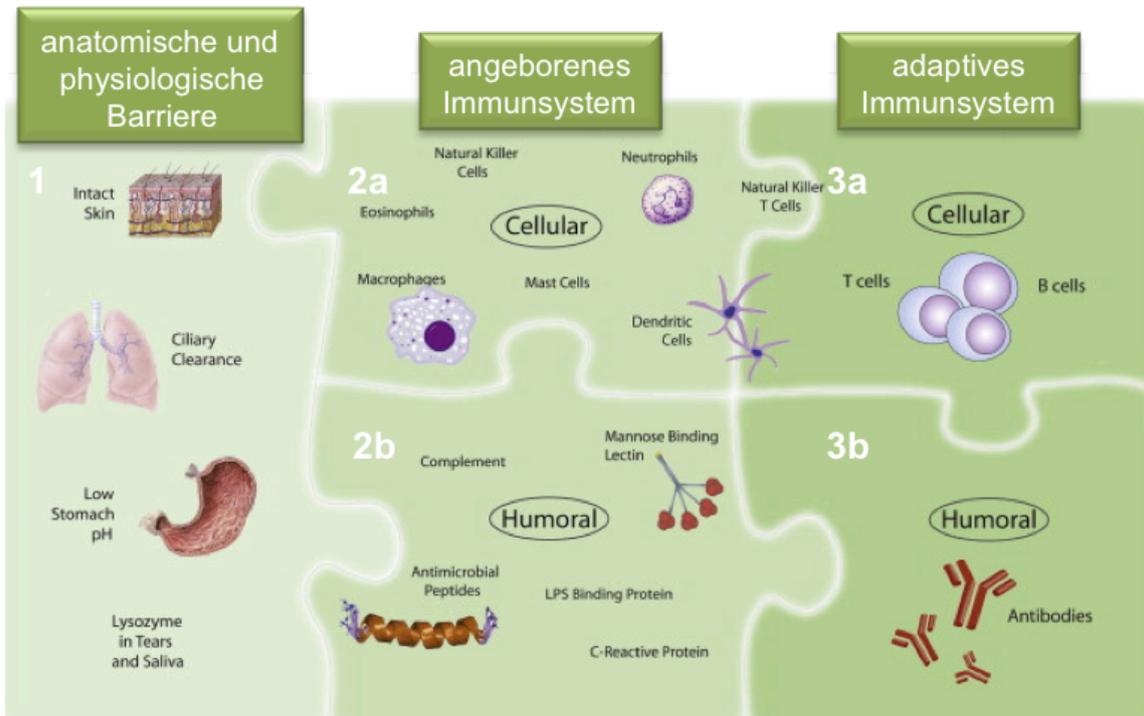
### 2.1 DAS IMMUNSYSTEM – EIN ÜBERBLICK

---

Das Immunsystem (von lat. *immunis* „frei“, „rein“) wird von Zellen und Molekülen gebildet, welche durch ein komplexes Zusammenspiel den Organismus von Lebewesen vor eindringenden Pathogenen und körpereigenen, entarteten Zellen schützen. Dieses Abwehrsystem dient der Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase und der Verhinderung von Gewebeschäden indem krankheitserregende, körperfremde Mikroorganismen erkannt und eliminiert sowie fehlerhafte Körperzellen zerstört und entfernt werden. Bakterien, Viren, Pilze, Einzeller wie Protozoen oder Plasmodien und Mehrzeller z.B. Parasiten stellen typische Krankheitserreger dar, die eine aktive Immunantwort zur Folge haben. Die Entwicklung einer individuellen „immunologische Toleranz“ dient dem Schutz des Körpers vor der Zerstörung gesunder und körpereigener Strukturen sowie zur Verhinderung vor Immunreaktionen auf apathogene, körperfremde Moleküle [1]. Hierbei wird Selbst von nicht-Selbst unterschieden, welches der Erhaltung der individuellen Unversehrtheit dient [2-4].

Das Immunsystem von Menschen und Wirbeltieren setzt sich aus einer passiven Barriere und aktiven angeborenen sowie erworbenen (adaptiven) Immunantworten zusammen (s.Abb. 2.1). Phylogenetisch entwickelte sich die komplexe Kombination aus angeborenem und adaptivem Immunsystem aus der schon früh stammesgeschichtlich vorhandenen angeborenen Immunabwehr [5], welche auch in Einzellern zu finden ist [6]. Überwinden Erreger die physikalische Abwehr aus Haut und Schleimhaut, ergänzt durch chemische Komponenten [7, 8] wie antimikrobielle Substanzen in Speichel, Mukus und Schweiß, werden die unterschiedlichen, sich ergänzenden aktiven Komponenten aus Rezeptoren, Mechanismen und Reaktionskaskaden zur Erkennung von Pathogenen des angeborene und erworbenen Immunsystems aktiviert [9-11]. Alle beteiligten Immunabwehrzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (engl. *haematopoietic stem cells*, HSCs) des Knochenmarks ab, welche sich über lymphatische und myeloide Vorläuferzellen entweder zu B-, T- Zellen und Neutralen Killer (NK)- Zellen oder Zellen der Phagozytenreihe (gr. *phagein* „fressen“) wie Monozyten,

Makrophagen, dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs), Mastzellen und Granulozyten weiterentwickeln [12].



**Abb. 2.1 Überblick der immunologischen Abwehr.** Mikrobielle Abwehr zusammengefasst in 3 Stufen: **1** anatomische und physische Barriere; **2** angeborenes Immunsystem: **2a** zelluläre Abwehr und **2b** humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems; **3** adaptives Immunsystem: **3a** zelluläre Abwehr und **3b** humorale Bestandteile des erworbenen Immunsystems. Brückenbildner zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystems stellen beispielsweise DCs und NKT- Zellen (Neutrale Killer- T- Zellen) dar (adaptiert und modifiziert nach American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, 2010 [13])

### 2.1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Das angeborene Immunsystem setzt sich zusammen aus zellulären und humoralen (lat. *humor* „Flüssigkeit“) Bestandteilen, deren Struktur genetisch festgelegt ist. Es reagiert unvermittelt nach Fremdkontakt innerhalb von Minuten und führt zu einer unspezifischen, nicht auf bestimmte Antigene festgelegten Abwehrreaktion.

### 2.1.1.1 LÖSLICHE FAKTOREN

Die Hauptaufgaben der mehr als 30 Plasma- Glykoproteine des Komplementsystems, wie beispielweise Proteasen, Anphylatoxine oder Lektine, bestehen in der Detektion, Bindung und zum Teil Destruktion von in den Körper eindringenden, pathogenen Strukturen durch Lyse sowie Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Beseitigung von Immunkomplexen aus Antigenen und Antikörpern [14, 15]. Zur effektiven Eliminierung von Fremdstoffen im Zusammenspiel von Komplement und phagozytotischen Immunzellen, heften sich Bestandteile des Komplementsystems über Rezeptoren an die Oberfläche des detektierten Pathogens und markieren es so erkenntlich zur Phagozytose (Opsonierung). Einzelne Fragmente von Komplementproteinen können als Zytokine zur Aktivierung von Immunzellen dienen [16], u.a. als potente Aktivatoren von Granulozyten [17].

Zytokine als Entzündungsmediatoren spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung sowie Regulierung von Differenzierung, Aktivierung und Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems [18]. Diese humoralen Botenstoffe sind kleine bis mittelgroße Polypeptide, welche hauptsächlich von immunologischen Zellen wie Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APCs) aber auch von anderen Zellen u.a. Endothel oder Keratinozyten sezerniert werden. Eine Untergruppe der Zytokine stellen Chemokine dar, welche proinflammatorisch chemotaktische Wirkung auf immunologische Zellen haben [19, 20]. Zytokine werden über spezifische Transmembranrezeptoren, mit hoher Affinität für das jeweilige Zytokin, auf der Oberfläche der Zielzellen gebunden [21], wodurch das extrazelluläre Signal des Zytokins in ein intrazelluläres Signal, meist in Kombination von Gentranskription, umgewandelt wird [18]. Zytokine werden je nach Auswirkung auf Entzündungsprozesse eingeteilt in proinflammatorische Zytokine wie z.B. *tumor necrosis factor* (TNF)-  $\alpha$ , Interferon (IFN)-  $\gamma$ , Interleukin (IL)- 1, IL- 2, IL- 6, IL- 8, IL- 12 und antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL- 10 und *transforming growth factor* (TGF)-  $\beta$  [22, 23].

Auch eine Reihe weitere Botenstoffe wie z.B. Proteasen und Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sind an der Signalübertragung der angeborenen Immunantwort beteiligt.

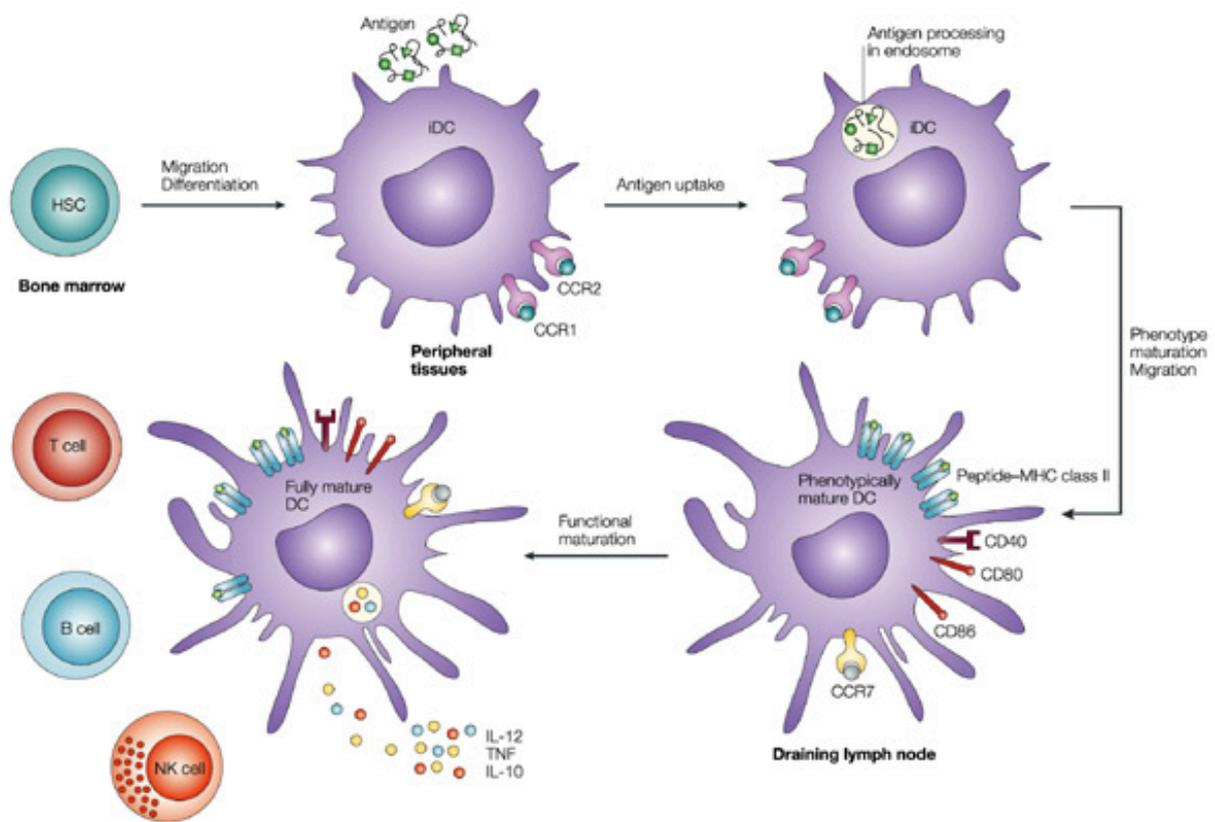
### 2.1.1.2 ZELLULÄRE KOMPONENTEN

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Monozyten, Makrophagen, DCs, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten und NK- Zellen. Sie alle erkennen invadierte Pathogene über *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), invariante molekulare Strukturen des mikrobiellen Metabolismus, welche einzigartig für Mikroorganismen sind. Hierzu gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Peptidoglycan und Lipopolysaccharid (LPS), bakterielles Flagellin, bakterielle oder virale RNA (engl. *ribonucleic acid*) oder bestimmte nicht-methylierte DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*)- Sequenzen von Bakterien wie CpG (Cytosin- Phosphat- Guanin)- Oligonukleotide [24, 25]. Zur Erkennung der PAMPs und zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremden Strukturen, verfügen die Zellen des angeborenen Immunsystems über Rezeptoren, PRRs (engl. *pathogen or pattern recognition receptors*) genannt [26]. Zu den wichtigsten PRRs gehören die extrazellulär oder in der Endosomenmembran gebundenen Toll- ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll- like receptors*, TLRs). Über TLRs werden nach Antigenkontakt, mittels Transkription in der Trägerzelle, Signalkaskaden ausgelöst, welche zur Aktivierung der immunologischen Abwehr führen [27-29]. Die intrazelluläre Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF $\kappa$ B) und der *mitogen- activated protein kinase* (MAPK)- regulierten Transkriptionsfaktoren durch TLR- Kommunikation führt über die Kombination der vier bekanntesten Adapterproteine MyD88, *TIR- domain- containing adapter protein* (TIRAP)/ *myeloid adaptor- like protein* (MAL), *TIR- domain- containing adaptor inducing IFN-  $\beta$*  (TRIF) und *TRIF- related adaptor molecules* (TRAM). Grob können die Signalwege in MyD88- oder TRIF- mediiert eingeteilt werden. Die an der externen Oberfläche von Trägerzellen lokalisierten Transmembranrezeptoren TLR2 [30-32] und TLR4 beispielsweise navigieren mittels TIRAP/ MAL MyD88- abhängig und TLR4 zusätzlich noch MyD88- unabhängig über TRAM TRIF- abhängig die Signaltransduktion [33, 34]. Die Hauptaufgaben der phagozytischen Zellen des angeborenen Immunsystems bestehen in der Eliminierung von Pathogenen durch Phagozytose, Zytokinsekretion und Antigenpräsentation durch Makrophagen und DCs. Die phagozytierten und prozessierten Antigene werden durch Makrophagen und DCs über Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I und II den Zellen des adaptivem Immunsystems

präsentiert und stellen so die Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar.

Neben Phagozytose, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation sind Makrophagen auch bestimmend an Heilungsprozessen durch Förderung von Granulationsgewebe und Angiogenese beteiligt [35, 36]. Gewebeständige Makrophagen stammen von Monozyten ab, welche unter physiologischen oder inflammatorischen Konditionen aus dem Blut ins Gewebe einwandern und sich dort zu Makrophagen oder z.T. auch DCs differenzieren [37, 38]. Abhängig von ihrer Lokalisation oder Funktion werden Makrophagen auch in der Lunge als Alveolar Makrophagen (AM), in der Leber als Kupffer- Sternzellen, in Knochen und Knorpel als Osteo- bzw. Chondoklasten genannt [39-41].

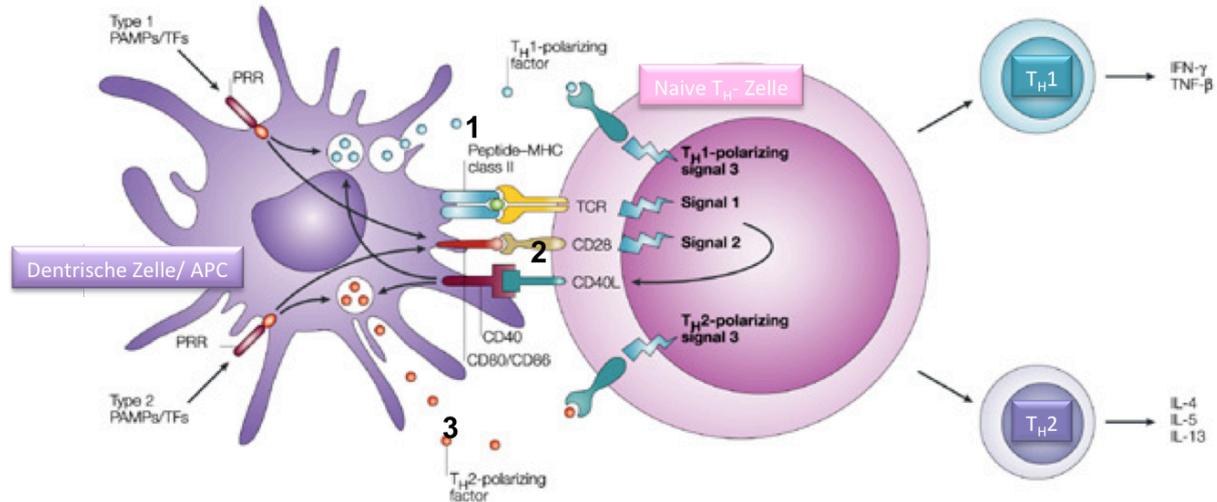
Ausgereifte DCs sind professionellen APCs, welche im Gegensatz zu Makrophagen eine primäre Immunantwort durch direkte Aktivierung naiver T- Zellen veranlassen können [42, 43] oder durch Präsentation von Selbst- Antigen zu einer Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen von T- Zellen beitragen um vor Autoimmunreaktionen durch autoreaktive T- Zellen zu schützen [44, 45]. Nach Aufnahme einer Fremdstruktur als unreife DCs (engl. *immature* DCs, iDCs) verlieren sie ihre phagozytischen Eigenschaften und differenzieren sich auf dem Weg zu sekundär lymphatischen Organen von unreifen Antigen- aufnehmenden in reife APCs (s.Abb. 2.2). iDCs, mit einer geringen Expression an MHC- II- und B7- Molekülen, kommen in allen Organen und im Blut vor, überwiegend aber in Oberflächenepithelien. Die Reifung wird durch die Erkennung von mikrobiellen Struktur molekülen über PRRs, aber auch durch pro- und antiinflammatorische Mediatoren wie Zytokine (TNF-  $\alpha$ , IL- 1, IL- 6, IL- 10, TGF-  $\beta$ ) [46] oder PGE<sub>2</sub> [47] und durch Ligation mit T- Zellen über CD40 (engl. *cluster of differentiation*) [48] induziert. Zusätzlich können auch angeborene Lymphozyten wie  $\gamma\delta$ - T- Zellen, Neutrale Killer- T (NKT)- Zellen und NK- Zellen durch Präsentation körpereigener Moleküle von transformierten Zellen zur Entwicklung der DCs beitragen [49, 50]. Während des Reifungsprozess kommt es zu einem phänotypischen Wandel der DCs, wobei die für ausdifferenzierte DCs charakteristischen Moleküle MHC- II-, CD40- , B7.1- (CD80) und B7.2- (CD86) und der Chemokinrezeptor 7 (CCR7) gesteigert an der Zelloberfläche exprimiert werden [51-53].



**Abb. 2.2 DC-Reifung nach Antigenkontakt.** Die sich aus HSCs entwickelten iDCs rekrutieren aus dem Knochenmark in periphere Gewebe, wo sie Antigene aufnehmen und über einen endosomalen MHC-Klasse-II-Signalweg prozessieren können. Während der Migration zu den drainierenden Lymphknoten zur Antigenpräsentation vollziehen die DC einen phänotypischen Reifungsprozess bei dem es zu einer erhöhten Expression von CD40, CD80, CD86, MHC-II-Molekülen und CCR7 an ihrer Oberfläche kommt. Über die Präsentation von Antigenpeptidfragmente über MHC-II-Moleküle und Interaktion mit antigenspezifischen Lymphozyten, wird der funktionelle Reifungsprozess abgeschlossen. Dies zeichnet sich durch Aktivierungskompetenz gegenüber anderer Immunzellen, wie T- B- und NK- Zellen, sowie Zytokinproduktion aus (adaptiert von HACKSTEIN und Mitarbeiter, 2004 [54]).

Nach Migration in sekundär lymphatische Organe, werden T- Zellen über komplexe, Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden aktiviert und zur klonalen Proliferation stimuliert. Zusammengefasst in 3 Aktivierungssignale (dargestellt in Abb. 2.3) verbindet sich im Erstkontakt der T- Zell- Rezeptor (engl. *t-cell receptor*, TCR) mit dem über MHC-II präsentierten Antigen auf der DC-Oberfläche, was dann zu weiteren Interaktionen von ko-stimulatorischen-Molekülen wie z.B. CD80 und CD86 von DCs mit CD28 auf der T- Zelle führt oder CD40 mit CD40 der jeweiligen Zelle [55, 56]. Als 3. Komponente der T- Zell- Aktivierung steht die Polarisation der T- Helfer- Zellen ( $T_H$ ) über Zytokine [57, 58] und andere Faktoren wie z.B. CD70-

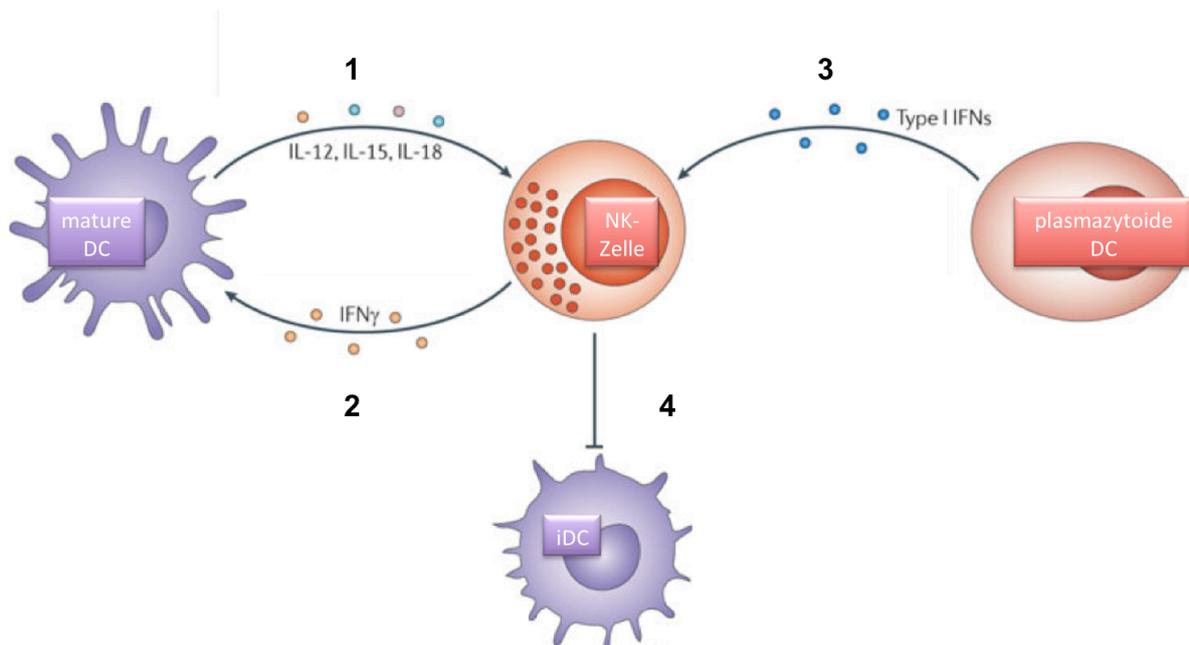
Exprimierung auf murinen DCs [59] und Rezeptor- Liganden- Bindung [60, 61]. Das Fehlen von Co- stimulatorischen Signalen führt zu Anergie oder Apoptose der T- Zellen [18, 62].



**Abb. 2.3 Aktivierung von T<sub>H</sub>- Zellen.** Die Signalkaskade zu Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup>- T- Zellen benötigt die Interaktion der Antigen- präsentierenden MHC- Moleküle der APCs (hier DC) mit dem antigenspezifischen TCR auf der T- Zelle(1), Verbindung der ko- stimulatorischen Moleküle (CD28 auf der T- Zelle mit CD80/86 der APCs; CD40 mit CD40L) (2) und Sekretion von Zytokinen(3). Diese fördern die Polarisation der T<sub>H</sub>0- Zellen in T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2- Richtung (adaptiert und modifiziert nach KASPENBERG und Mitarbeiter, 2003 [63]).

DC haben mittels ihrer Produktion an Zytokinen einen weitreichenden Einfluss auf andere Immunzellen [64]. Besonders im Entzündungsgebiet und auch in lymphatischen Organen besteht eine enge Assoziation zwischen NK- Zellen und DCs [65, 66] u.a. durch sezerniertes IL- 12 [67, 68] oder direkte NK- Zell- Aktivierung über Zellkontakt mittels DCs [69] (s. Abb. 2.4). Die korrelative IL- 12- Sekretion stimuliert und aktiviert beide Zellpopulationen und führt in den DCs zu einer erhöhten IL- 18- oder IFN Typ I-Freisetzung, welche wiederum die Zytotoxizität in den NK- Zellen steigert [70, 71]. NK- Zellen wiederum nehmen regulatorisch Einfluss auf DCs indem sie iDCs lysieren, was zu einer qualitativ besseren Immunantwort über effizientere Antigenpräsentation durch ausgereifte DCs führt [72]. Die lymphoiden NK- Zellen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems können über ihre klassische zytotoxischen Funktion [73, 74] die Apoptose von infizierten oder entarteten Zellen nach Erkennung mittels PRRs [75, 76] und Unterscheidung zu körpereigenen, gesunden Zellen [77-79] einleiten. Dies geschieht entweder über Zellyse durch Enzymen wie Perforin, Granzyme oder aber Rezeptor- vermittelt (z.B. über

Fas/ CD95; *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) und Caspase- abhängig [80]. Mittels ihrer regulatorischen Fähigkeiten durch Zytokin- und Chemokinsekretion sowie durch direkten Zellkontakt nehmen aktivierte NK- Zellen großen Einfluss auf das angeborene sowie erworbene Immunsystem [81-84]. Über IL- 12 rekrutierte NK- Zellen beispielweise fördern eine  $T_H1$ - Immunantwort durch IFN-  $\gamma$ - Produktion und Sekretion, was wiederum zu einer Verstärkung der zellulären Immunantwort führt [85-87]. Neben der hauptsächlichen Sekretion an IFN-  $\gamma$ , *granulocyte- macrophage colony- stimulating factor* (GM- CSF), und TNF-  $\alpha$  [87, 88], können NK- Zellen auch  $T_H2$ - assoziierte Zytokine wie IL- 5, IL- 10 und IL- 13 produzieren [89, 90]. Im Gegensatz zu anderen Lymphozyten kann die Aktivierung von NK- Zellen (z.B. durch Makrophagen und DCs [74, 76]) oder durch direkte PAMP-Erkennung [91]) mit einer Differenzierung zu Gedächtniszellen [92-94] einhergehen, jedoch unabhängig von spezifischer Antigen- Erkennung und ohne klonale Expansion [95, 96].

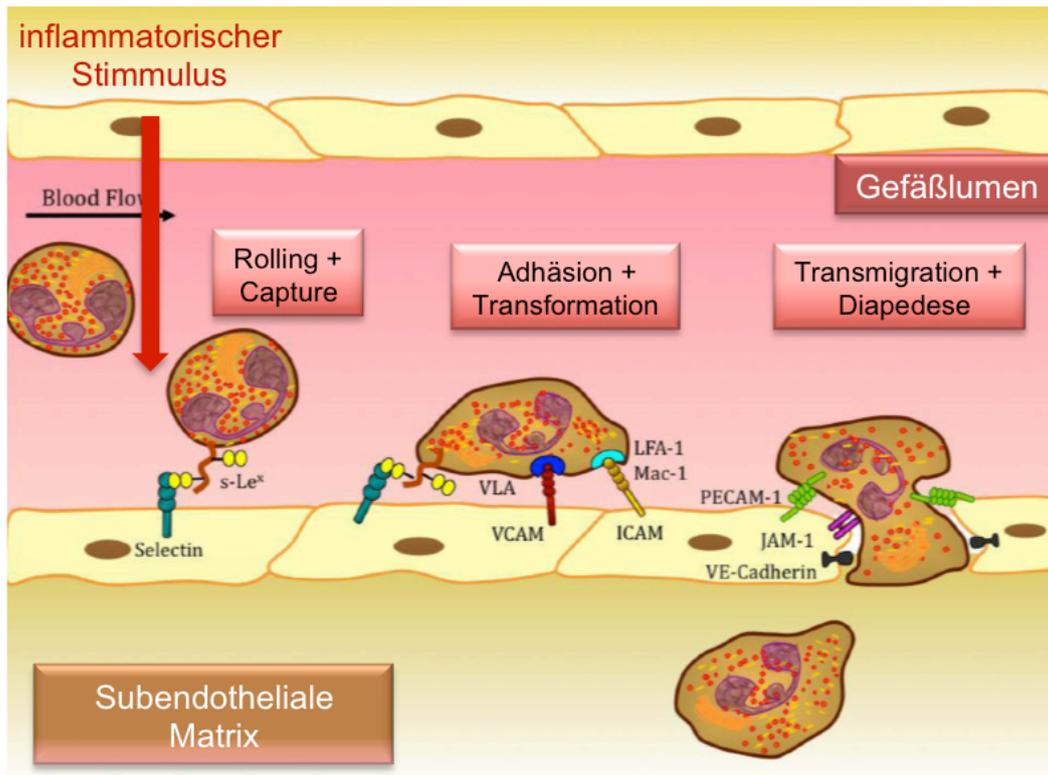


**Abb. 2.4 Interaktion zwischen NK-Zellen und DCs.** 1+ 3 Aktivierte DCs sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL- 12, IL- 15, IL- 18 und IFN Typ I, welche wiederum NK- Zellen stimulieren. IL- 18 und IFN Typ I fördern die Zytotoxizität in NK- Zellen, wobei IFN Typ I zusätzlich zu einer erhöhten NK- Zell- Proliferation führt. 2 Das von aktivierten NK- Zellen produzierte IFN-  $\gamma$  unterstützt die DC- Reifungsprozesse und polarisiert die Immunantwort in Richtung  $T_H1$ . 4 Durch die Eliminierung von iDCs durch aktivierte NK- Zellen, wird eine verbesserte Antigenpräsentation durch ausdifferenzierte DCs gefördert und somit eine adaptive Immunantwort induziert (modifiziert nach ALTFELD, 2011[97])

Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten sind typischerweise an allergischen Reaktionen und immunologischer Abwehr gegen Parasiten beteiligt. Sie haben eine eher untergeordnete Rolle während steriler Entzündungsprozesse [98-100].

### 2.1.1.3 GRANULOZYTEN

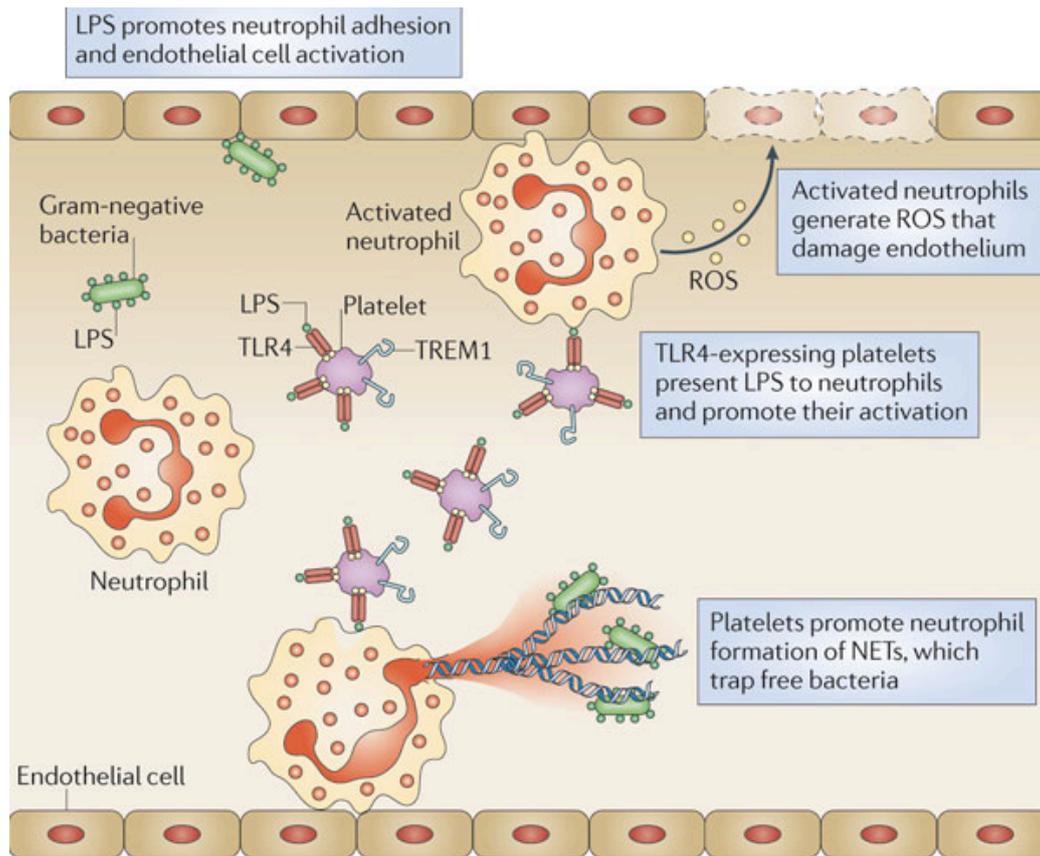
Die zu den Phagozyten gehörigen Granulozyten (lat. *granulum* „Körnchen“) werden auch polymorphkernige Leukozyten (gr. *poly* „viele“; gr. *morph* „Gestalt“, PMNs) wegen der vielgestaltigen Form des Zellkerns genannt. Die Einteilung der funktionell unterschiedlichen PMNs in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten geschieht namensgebend aufgrund des Färbeverhaltens ihrer Granula in der Giemsa-Färbung. Diese vielgestaltigen, aber kurzlebigen Zellen machen ca. 2/3 der Blutleukozyten aus, wovon der größte Teil neutrophile Granulozyten sind [101]. Granulozyten werden nach Bildung im Knochenmark ins Blut abgegeben und können nach Aktivierung über humorale Botenstoffe aktiv ins Gewebe einwandern. Dieser mehrstufige Diapedeseprozess (gr. *dia* „hindurch“, gr. *pedan* „springen“) aus den Blutgefäßen zum Ort der Entzündung umfasst Entlangrollen an der Gefäßwand (*Rolling*) über lose Bindungen von L-Selektin auf den Granulozyten an P- und E-Selektin auf dem Gefäßendothel (*Capture*), Erhöhung der Integrin-Affinität auf dem Gefäßendothel durch Chemokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , was zu einem verlangsamten *Rolling* der Granulozyten führt (*slow Rolling*) [102], Adhäsion der Granulozyten mittels Integrinen an Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule-1*) und ICAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule-1*) [103, 104] der endothelialen Oberfläche mit einhergehender Formveränderung des Zytoskeletts der Granulozyten mit einer Varianz des Zelldurchmesser von 2 bis 15  $\mu\text{m}$  sowie Volumenverlust [105], und zuletzt Durchtritt durch das Endothel ins Gewebe [106] (Transmigration) mit Hilfe der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie z.B. PECAM-1 (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) [107, 108]. Dem Zytokin-Konzentrationsgradienten folgend migrieren die Granulozyten mittels Ausbildung von Pseudopodien in ihr Zielgewebe [109]. Die einzelnen Vorgänge sind in Abb. 2.5 veranschaulicht.



**Abb. 2.5 Diapedese von Granulozyten aus dem Gefäßlumen in Entzündungsgewebe.** Zur Vorbereitung der transendothelialen Migration von PMNs werden lose Verbindungen zwischen der an der Gefäßwand entlangrollenden Zelle und der Endotheloberfläche über Selektine geknüpft (*Capture*). Dies führt zu einer verlangsamten Bewegung der PMNs (*slow Rolling*) und letztendlich zu einer Adhäsion der sich transformierenden PMNs an der Gefäßwand durch Interaktion von Integrinen an der Granulozytenoberfläche und Adhäsionsmolekülen des Endothels. Über komplexe Bindungsprozesse der PMNs mit den Molekülen der endothelialen Zell- Zell- Verbindungen wie PECAM- 1 migrieren die PMNs durch die endotheliale Gefäßwand in Richtung Zielgewebe (adaptiert und modifiziert nach YUAN *et al*, 2012 [110]).

Nicht nur infizierte, sondern auch beispielsweise traumatisch bedingte sterile Entzündungsprozesse führen zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [111-113]. Neutrophile Granulozyten sind maßgeblich an der angeborenen Immunantwort durch Wunddebridement im entzündeten oder verletzten Gewebe und Beseitigung von Fremdstrukturen über ihre phagozytische sowie antimikrobielle Eigenschaften beteiligt [6, 114, 115]. Nach Erkennung der Pathogene über PRRs auf der Granulozytenoberfläche und Opsonierung durch Komplement werden diese phagozytiert sowie mittels in Granula befindlichen Enzymen eliminiert oder über Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) und Bildung von NETs (engl. *neutrophil extracellular traps*) abgetötet [116-118]. Bei der sauerstoffabhängigen Bakterienabtötung produzieren zelleigene Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat (NADPH)- Oxidasen [119-121] Hyperoxidanionen ( $O_2^-$ ) und

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welche dann durch chemische Reaktion mit anderen antimikrobiellen Substanzen ROS bilden [122-124]. Die Freisetzung dieser reaktiven und toxischen Komponenten resultiert in der Zerstörung und Abtötung des Pathogens, oft einhergehend mit Zelltod des Granulozyts und Schädigung des umliegenden Gewebes [125, 126].  $IFN-\gamma$  ist ein Primer für diesen *oxidativen Burst* (engl. *burst* „Ausbruch“) [127-129]. NETs stellen einen Komplex aus dekondensiertem Chromatin, Granula und cytoplasmatischen Proteinen dar [130], welche als freigelegte fibrilläre Matrix gleichzeitig mit ROS von PMNs in die Umgebung abgegeben werden [131, 132]. Dieser mit Zelltod der neutrophilen Granulozyten einhergehende Prozess wird zur Bekämpfung von Pathogenen, welche ggf. zu groß zur Phagozytose sind, angewendet [133, 134]. Die durch NETs festgehaltenen Fremdorganismen werden letztendlich über antimikrobielle Proteine abgetötet [130, 133]. Die unterschiedlichen Pathogen-Bekämpfungsmechanismen neutrophiler Granulozyten sind in Abb. 2.6 nochmals erläutert.



**Abb. 2.6 Antimikrobielle Mechanismen von neutrophilen Granulozyten.** Nach Erkennen von Pathogenstrukturen (hier dargestellt gebunden an TLR4-exprimierende Thrombozyten) können PMNs in Abhängigkeit von Andauer und Infektionsdruck verschiedene Effektorfunktionen aktivieren. Neben der Phagozytose, welche zeitlich gesehen die schnellste Elimination einzelner Erreger darstellt, können größere Pathogenmengen über Degranulation und Produktion von ROS antibakteriell beseitigt werden, allerdings oft einhergehend mit Schäden des umliegenden Gewebes und des PMN. Ausbildung von NETs werden dann erforderlich, wenn Erreger beispielsweise zu groß sind zu Phagozytose, wobei hierbei der Granulozyt apoptotisch wird, aber das umliegende Gewebe nicht geschädigt wird (adaptiert nach SEMPLE und Mitarbeiter, 2011[135]).

Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen am Ort des Entzündungsgeschehen, wo sie durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen u.a.  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , *macrophage inflammatory protein* (MIP)- $1\alpha$  zur Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und DCs beitragen sowie eine adaptive Immunantwort indirekt initiieren [101, 136]. Aber auch verschiedene Zytokine können unterschiedliche Wirkungen auf neutrophile Granulozyten haben. GM-CSF beispielsweise ist ein typischer Überlebensfaktor [137, 138],  $\text{TNF-}\alpha$  ein potenter Aktivator [139-143],  $\text{IFN-}\gamma$  fördert die Chemokinfreisetzung [128, 144, 145] und *keratinocyte derived chemokine* (KC) sowie MIP-2 sind maßgeblich an der

Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in inflammatorischen Geweben beteiligt [146, 147].

Apoptotische Granulozyten werden, zur Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion und zum Schutze des Gewebes, von Makrophagen [148-150] und anderen neutrophilen Granulozyten [151-153] erkannt und mittels Phagozytose beseitigt. Zur effektive Ausführung von regenerativen Prozessen, immunologischer Abwehr und direkter antimikrobieller Bekämpfung im infizierten oder traumatisierten Gewebe [154, 155], kommt es unter Einfluss verschiedener Signale des inflammatorischen Milieus zu *delayed Apoptose* (engl. *delayed* „verzögert“) neutrophiler Granulozyten [156-158]. Hierbei wird die durchschnittliche Überlebenszeit der neutrophilen Granulozyten, nach Aktivierung über Pathogenstrukturen oder vermittelt durch andere Immunzellen, von sechs bis zehn Stunden [159, 160] bis zu 24h verlängert [101, 138, 161].

---

## 2.1.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

---

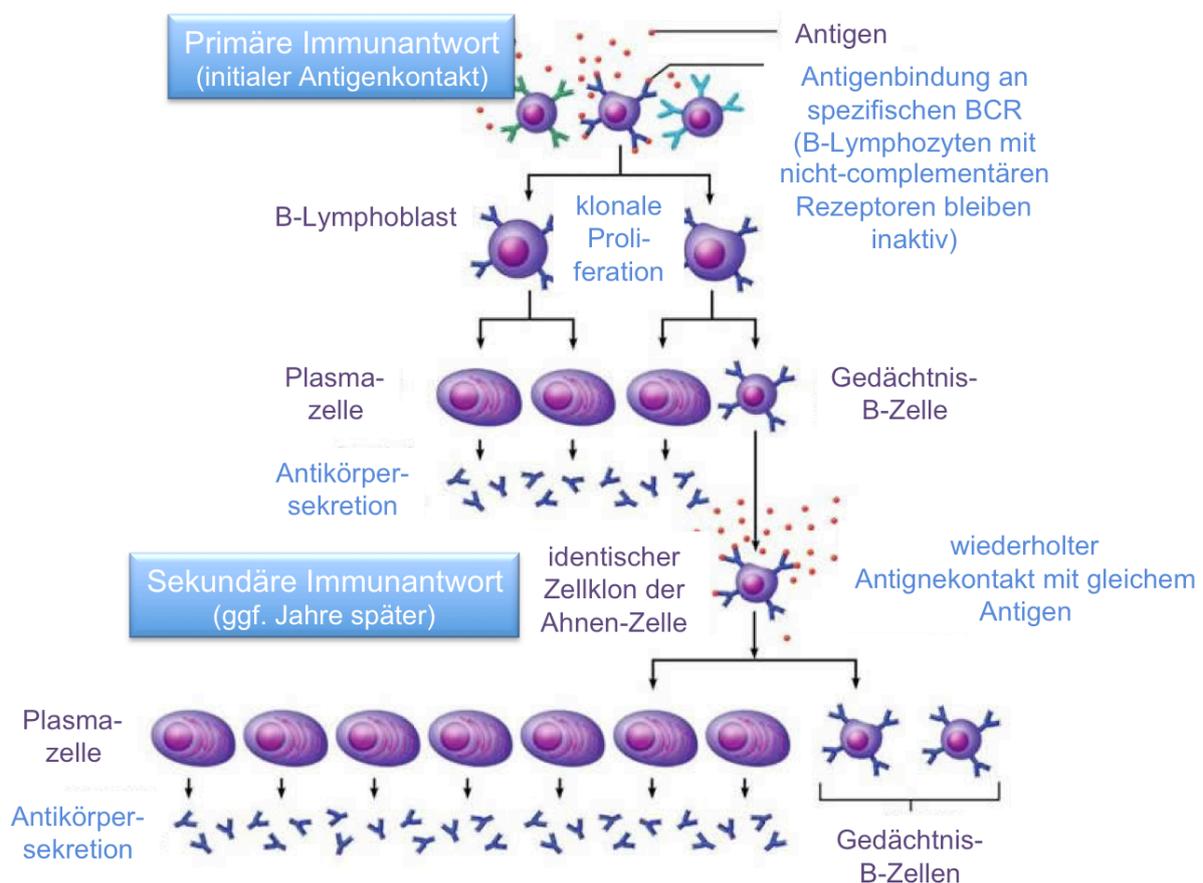
Das erworbene Immunsystem stellt eine spezifische, zielgerichtete Immunantwort dar, welche mit klonaler Expansion und Gedächtnisbildung einhergeht. Die aus lymphoiden Vorläuferzellen abstammende T- Zellen und B- Zellen bilden die zelluläre Komponente dieser immunologischen Abwehr, woraus B- Lymphozyten sich zu Plasmazellen und Gedächtniszellen differenzieren können.

### 2.1.2.1 B- LYMPHOZYTEN

---

B- Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und zirkulieren als ausgereifte Zellen im Blut oder in lymphatischen Organen wie Thymus, Milz und Lymphknoten. Nach Antigenerkennung sowie -bindung über ihren spezifischen BCR (*B- cell receptor*) oder ihre unspezifischen TLRs, wandern sie in sekundär lymphatische Organe, wo es nach Antigenpräsentation mittels MHC- II- Molekülen gegenüber den T- Zellen zur Aktivierung der B- Zelle über Wechselwirkungen mit ko- stimulatorischen Signalen von T<sub>H</sub>- Zellen kommt [162-164]. B- Lymphozyten erkennen Pathogene auch als ganze Struktur und es bedarf keiner unbedingten

Präsentation über MHC- Moleküle. In Folge der Aktivierung proliferieren und differenzieren B- Lymphozyten in Antikörper- produzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen [165, 166] (s. Abb. 2.7). Diese Antikörper besitzen dieselbe Spezifität wie der BCR der vorausgegangenen B- Zelle und sind Teil der humoralen Komponente der adaptiven Immunantwort. Die Eliminierung des Pathogens findet nach Bildung eines Komplexes durch Antigenbindung an die Antikörper entweder direkt durch Neutralisierung des Pathogens, Opsonierung dieser zur Phagozytose oder über die Aktivierung der Komplementkaskade [3, 167, 168] statt. B- Lymphozyten übernehmen aber auch regulatorische Funktion in der Immunantwort u.a. die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- T- Zellen [169-171].



**Abb. 2.7 Differenzierung von B- Zellen.** Nach Bindung eines Antikörpers an den hierfür spezifischen B- Zell- Rezeptor (BCR) differenziert der B- Lymphozyt nach klonaler Proliferation in Plasmazellen zur Antikörperproduktion und Gedächtniszellen. Kommt es zu einem Zweitkontakt mit dem gleichen Antigen differenzieren die Gedächtniszellen in multiple Antikörper- sezernierende Plasmazellen und wiederum Gedächtniszellen für eine schnelle und effektive sekundäre Immunantwort (adaptiert und modifiziert nach Midlands Technical College [172]).

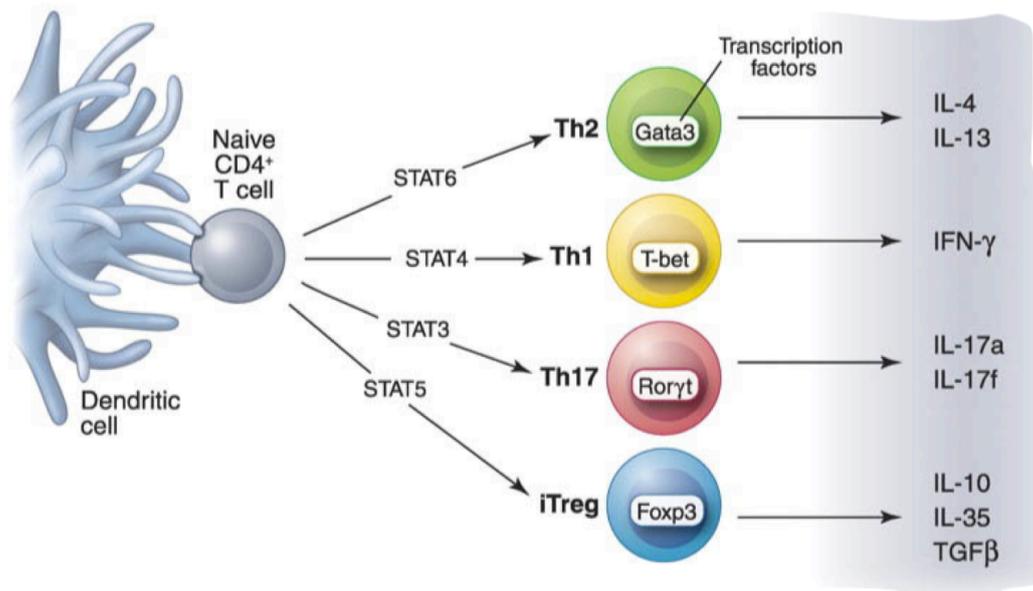
### 2.1.2.2 T- LYMPHOZYTEN

Die Entwicklung von T- Lymphozyten führt nach der Bildung im Knochenmark über einen Reifungs- und Selektionsprozess im Thymus [173, 174] zur Freisetzung in die Peripherie von naiven T- Zellen in 2 Subgruppen mit den Oberflächenmarkern  $CD4^+$  oder  $CD8^+$ . T- Lymphozyten können im Gegensatz zu B- Lymphozyten Pathogen nur nach Präsentation von Peptidfragmente über MHC- Moleküle mittels ihrer TCR erkennen und binden. Neben diesen T- Zellen mit typischen  $\alpha\beta$ - TCR gibt es noch  $\gamma\delta$ - T- Zellen, deren TCRs aus  $\gamma$ - und  $\delta$ - Untereinheiten bestehen. Die Aktivierung dieser Lymphozyten kann rezeptorabhängig sowie unabhängig geschehen und führt nach Erkennung von Gewebeschäden oder Pathogenen zu der Initiierung der angeborenen wie adaptiven Immunantwort [175-177].

Cytotoxische  $CD8^+$ - T- Zellen sind effektiv an der adaptiven Immunantwort während intrazellulärer Infektionen beteiligt. Sie erkennen Antigene gebunden an MHC- Klasse- I- Moleküle, welche auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert werden. Nach Aktivierung differenzieren  $CD8^+$ - T- Zellen in Effektorzellen, als welche sie in infizierten Zellen über Enzyme wie Perforin und Granzyme den programmierter Zelltod einleiten, oder werden zu Gedächtniszellen um effektiv vor erneuter Infektion mit denselben Erregern (Reinfektion) zu schützen [178-182].

$CD4^+$ - T- Zellen kommen in den Subgruppen der  $T_H$ - Zellen ( $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ) und regulatorischen T- Zellen ( $T_{reg}$ ) vor [183-185] (s. Abb. 2.8).  $T_H$ - Zellen sind nach Aktivierung durch Bindung mittels ihres TCRs an Antigen- MHC- II- Molekül- Komplexe [186] an der Koordination der Immunantwort u.a. durch Freisetzung von humoralen Botenstoffen beteiligt. Zusätzlich kommt es zu klonaler Proliferation. Das autokrin- wirkende Zytokin IL- 2 wird von den aktivierten T- Zellen sezerniert und stimuliert die Differenzierung der naiven T- Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen [187]. Nach Polarisierung [188-191] in die antagonistisch wirkende  $T_H1$ - oder  $T_H2$ - regulierte Immunantwort [192-194], verstärken  $T_H1$ - Zellen typischerweise die zelluläre Immunantwort über Sekretion von  $T_H1$ - Zytokine wie  $IFN-\gamma$ , IL- 2 und  $TNF-\alpha$  wohingegen  $T_H2$ - Zellen vermehrt die Antikörperproduktion mittels  $T_H2$ - Zytokinen wie IL- 4, IL- 5, IL- 6, IL- 10 und IL- 13 fördern [57].  $T_H17$ - Zellen sind regulatorisch an Autoimmunreaktionen und Entzündungsprozessen beteiligt u.a. durch Rekrutierung

von neutrophilen Granulozyten über IL-17-Sekretion [195-197]. Die über  $T_H1$ -Zytokine regulierte Immunantwort führt zu Aktivierung von Makrophagen, verbesserter Antigenpräsentation der APCs, Vasodilatation, verbesserte Migration von Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems durch Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothel und regen B-Zellen zur Produktion von Immunglobulin (Ig) G an. Die Interaktion von  $T_H2$ -Zellen und B-Lymphozyten steigert besonders die Bildung und Ausschüttung von Antikörpern und veranlasst über sezerniertes IL-4 „Isotypenswitch“ der neutralisierten Antikörperklassen von IgM zu IgA, IgE und IgG. Zusätzlich können  $T_H2$ -Zellen Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten stimulieren.  $T_{reg}s$  exprimieren die Oberflächenmarker  $CD4^+ CD25^+$  *forkhead box P3* ( $FOXP3^+$ ) [198] und sind im Stande die Immunreaktion durch eingreifende Maßnahmen zu modulieren und zu regulieren [199]. Sie fördern die Toleranz gegen körpereigene Stoffe und schützen so vor Autoimmunreaktion, können aktiv Apoptose über Fas/ FasL-Verbindungen in anderen Zellen auslösen und periphere T-Zellen deletieren. Es kommen aber auch induzierte  $T_{reg}s$  ( $iT_{reg}$ ) vor, welche sich aus naiven  $CD4^+ CD25^- T_{reg}s$  thymusunabhängig entwickeln [200, 201].



**Abb. 2.8 Differenzierung von naiven  $CD4^+$ -T-Zellen nach Antigenpräsentation durch APCs in verschiedene Effektorzellen.** Naive  $CD4^+$ -T-Zellen können je nach externen Aktivierungseinfluss in  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  oder  $iT_{reg}$  differenzieren (modifiziert nach O'SHEA und Mitarbeiter, 2010[202]).

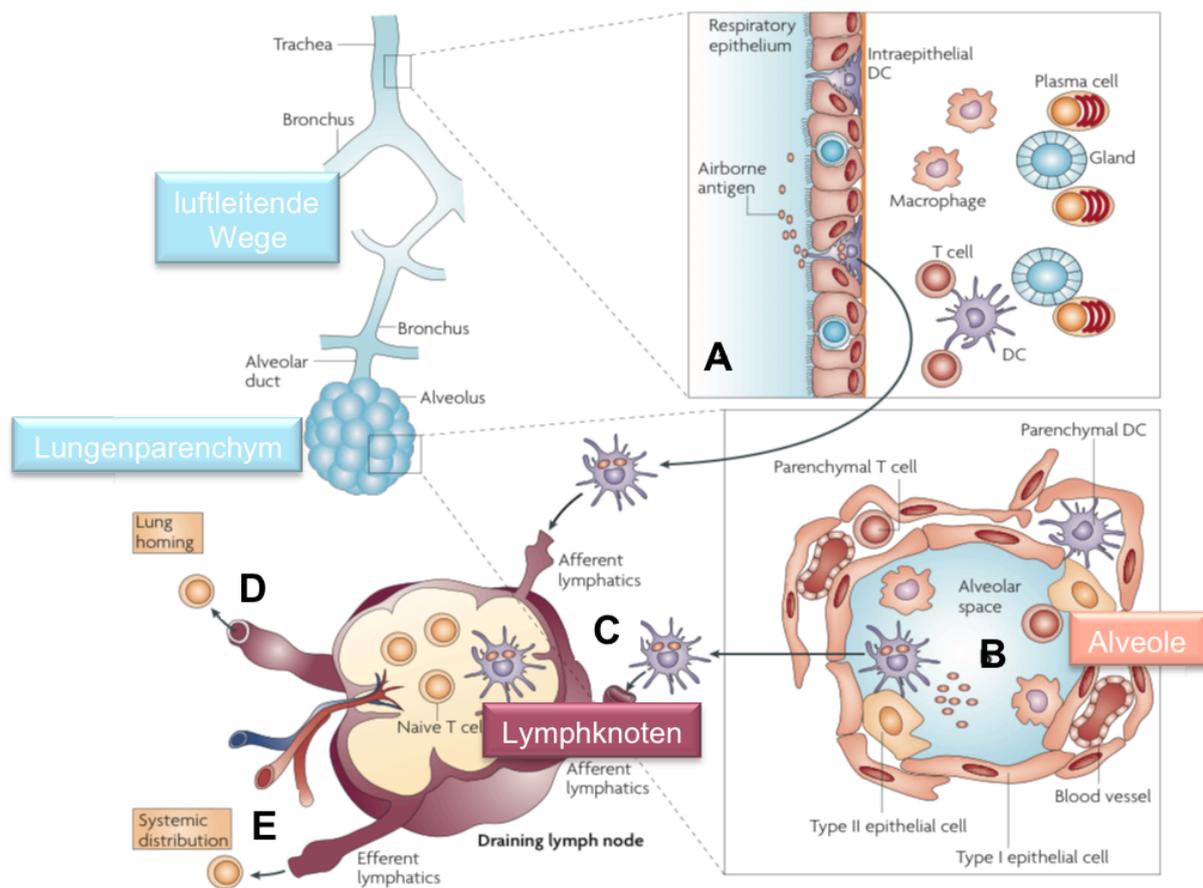
Eine Zwischenform zwischen T- Zellen und NK- Zellen stellen NKT- Zellen dar. Sie exprimieren einen spezifischen TCRs, differenzieren aber nicht zu Gedächtniszellen und sind über lytische oder regulatorische Aktivität an der Immunantwort beteiligt. Nach Antigenerkennung durch Antigenpräsentation über CD1d [203, 204] sezernieren sie typischerweise IL- 4, IL- 10 und IFN-  $\gamma$ , Zytokine der T<sub>H</sub>1- sowie T<sub>H</sub>2- Immunantwort [205], und führen zu einer Aktivierung von DCs, NK- Zellen sowie T- und B- Lymphozyten [206, 207].

## 2.2 IMMUNABWEHR IN DER LUNGE

---

Der Atmungsapparat wird in einen oberen und einen unteren Atemtrakt und in luftleitende Wege und die gasaustauschende Lunge eingeteilt. Die inhalierte Umgebungsluft wird über Bronchien zu den Alveolen geleitet, in denen die Oxigenierung des Blutes stattfindet. Das Alveolarepithel besteht aus den ausdifferenzierten Pneumozyten Typ I, welche mit Kapillarendothel und Basallamina die Blut- Luft-Schranke bilden, und den mitotisch aktiven Pneumozyten Typ II, welche den lipid- und proteinhaltigen Surfactant als Antiatelektasfaktor produzieren und zur Epithelzellregeneration nötig sind [208]. Die Immunabwehr in der Lunge, bestehend aus angeborenem und erworbenem Immunsystem, wird unterstützt durch physikalische Barrieren und antibakterielle Produkte wie z.B.  $\beta$ - Defensine [209-211], Lactoferrine und Lysozyme [212-214], wie sie auch in Mukus zur *Mikrozillialen Clearance*, Hydratation der Luftwege und Einfangen von Pathogenen vorhanden sind [215]. Eingeatmete Fremdstrukturen treffen im ersten Kontakt auf Lungenepithel [216-218], welches passiv als physikalische Barriere fungiert und aktiv PAMPs über Rezeptoren wie TLRs [219-221] erkennt um eine weitere Immunantwort durch funktionelle Moleküle, wie Zytokine, oder Zell- Zell- Kontakt mit Immunzellen zu induzieren [222-227]. Regulierend und chemotaktisch nimmt das alveolare Epithel Einfluss auf das adaptive Immunsystem z.B. durch Rekrutierung von DCs [228, 229], welche wiederum zur weiteren Immunabwehr in Interaktion mit B- , T- und NK- Zellen stehen [230, 231], T<sub>H</sub>1- sowie T<sub>H</sub>2- Zellen über *monocyte chemotactic protein-2* (MIP- 2)- Rezeptor- Liganden- Bindung [232-235]. MIP- 2 und dessen Rezeptor (Chemokinrezeptor 3, CXCR3) zeigen zusätzlich antimikrobielle Wirkung [223, 236].

Die Immunabwehrmechanismen laufen unter ständiger Kontrolle der respiratorischen Mukosa um überschießende Immunreaktionen auf z.B. apathogene, inhalierte Strukturen zu verhindern [237]. An diesen noch nicht ganz bekannten Prozessen sind nicht-inflammatorische  $T_H2$ -Zellen [238], T-Zell-vermittelte Antigen-Toleranzbildung [239, 240] unter Kontrolle von DCs [241-243] und die inhibitorische Aktivität von AMs gegenüber T-Zellen über IL-10-Produktion beteiligt [244, 245]. Gerade AMs, welche einen Großteil der Lungenleukozyten ausmachen und sich aus Blutmonozyten differenzieren [246], fangen eingeatmete Antigene ab [247, 248] ohne als APCs [245, 249] zu fungieren und supprimieren unspezifisch eine adaptive Immunantwort um das lokale Lungengewebe vor ständiger, spezifischer oder dysregulierter Entzündungsreaktion zu schützen [250-252]. Nach Aktivierung durch PAMPs oder Zytokine allerdings fungieren sie als Effektorzellen durch Antigenpräsentation, Phagozytose [253] und Koordinierung der angeborenen Immunantwort [254, 255]. Im Entzündungsgeschehen wird die Migration von neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen in die Lunge zur immunologischen Abwehr durch Chemokinsekretion von AMs wie auch Lungenepithel initiiert [256-259]. Über Phagozytose, Degranulation, ROS- und NET-Produktion [130] sowie Zytokinsekretion zur Anlockung weiterer Immunzellen (wie in Kapitel 2.1.1.3 detailliert beschrieben), sind PMNs direkt an der Pathogenabwehr in der Lunge beteiligt. Neben stationären NK-Zellen in der Lunge, deren zytotoxische Kapazität während der Homöostase durch AMs [260, 261] supprimiert wird [262-264], werden auch in kurzer Zeit nach Inflammation zirkulierende NK-Zellen aus dem Blut in die Lunge rekrutiert und aktiviert [265-267]. Die aktivierten, IFN- $\gamma$ -produzierenden [268] NK-Zellen tragen durch direkte Lyse infizierter Zellen [269, 270] oder durch Beeinflussung der adaptiven Immunantwort, durch Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [271-273], zu einer aktiven immunologischen Abwehr bei. In Abb. 2.9 wird die Immunreaktion auf inhalierte Antigene erläutert.



**Abb. 2.9 Antigenkontakt und Induktion der Immunantwort in der Lunge.** Eingeatmete Antigene werden von lokalen DCs, welche im Oberflächenepithel der **A** bronchialen Mukosa oder **B** Lungenalveolen angesiedelt sind, registriert und aufgenommen. Nach Antigenkontakt exprimieren die DCs verstärkt CCR-7 und migrieren durch afferente Lymphbahnen zum drainierenden Lymphknoten **C** zur Antigenpräsentation gegenüber naiven, antigenspezifischen T- Zellen. Nach klonaler Proliferation migrieren die aktivierten Effektor-T- Zellen über efferente Lymphbahnen, das Blut und den *Ductus thoracicus* entweder in die bronchiale Mukosa **D** oder agieren im peripheren Immunsystem **E** z.B. der Mukosa anderer Organe (adaptiert und modifiziert nach HOLT und Mitarbeiter, 2008 [237]).

Im gesunden Organismus befinden sich in allen alveolaren Zwischenräumen anliegend den pulmonalen Gefäßen stationäre, alveolarmukosaständige DCs, welche durch ständige Antigenerfassung der Immunkontrolle dienen aber kaum Antigen- präsentierende Funktion haben [238], sowie unreife DCs zur Überwachung des Mukosagewebes um eingeatmete Antigene als reife DCs in den regionalen Lymphknoten gegenüber Lymphozyten zu präsentieren. Diese DCs werden im Knochenmark neu gebildet [237] oder differenzieren unter Einfluss von Epithel aus Monozyten [274]. Während entzündlicher Prozesse in der Lunge unterstützen, fördern sowie regulieren DCs die lokale Immunantwort [275, 276] und erhöhen durch Migration [277, 278] die Anzahl an DCs als professionelle APCs.

Phänotypisch kommen CD8<sup>+</sup>- sowie CD4<sup>+</sup>- T- Lymphozyten als Effektorzellen und/ oder Gedächtniszellen vor, wobei sich zytotoxische CD8<sup>+</sup>- T- Zellen hauptsächlich intraepithelial befinden und die CD4<sup>+</sup>- T- Zellen neben Antigen- präsentierenden B- Zellen, Plasmazellen und Mastzellen zum größten Teil in der Basallamina des Lungengewebe zu finden sind [237, 279]. B- Lymphozyten können T- Zell- abhängig und -unabhängig [280, 281] (z.T. über Alveolarepithel [282]) aktiviert werden und produzieren gerade in den oberen Atemwegen kontinuierlich Immunglobuline (va. IgA) zur direkten immunologischen Abwehr von Pathogenen [283-285]. Nach Antigen- Stimulation in der Lungen persistieren B- Zellen und DCs noch über Monate im Alveolarraum [286, 287].

### 2.3 IMMUNMODULATION NACH TRAUMA

---

Der Begriff Trauma (gr. *trauma* „Wunde“, „Verletzung“) beschreibt als medizinischer Terminus die physische Verletzung eines Körpers durch externe Gewalteinwirkung und umfasst das gesamte Verletzungsgeschehen. Hierbei werden die direkten schädigenden Wirkungen der einzelnen Verletzungen, wie z.B. Wunden, Quetschungen, Frakturen in Kombination mit der indirekten Auswirkung auf den Gesamtorganismus wie z.B. durch Blutverlust, Fettembolie, Nierenversagen als ein komplexes Krankheitsgeschehen betrachtet. Traumata können u.a. eingeteilt werden in nicht- lebensbedrohliche (Monotraumata; gr. *monos* „allein“) und lebensbedrohliche Einzelverletzungen (Barytraumata; gr. *barys* „schwer“) sowie lebensbedrohliche Mehrfachverletzungen (Polytraumata; gr. *polys* „viele“), welche sich aus synchron geschehenen Verletzungen mehrerer Organe oder Körperregionen zusammensetzen. Inflammatorische Entgleisung des Immunsystems kann, ggf. durch genetische Prädisposition unterstützt [288], zu funktionellem Versagen von Organen fern des eigentlichem Traumageschehens führen [289]. Im Jahresbericht 2012 des Traumaregister ([www.traumaregister.de](http://www.traumaregister.de)) der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) sind über 23.000 Traumapatienten (95% stumpfen Traumata) für das Jahr 2011 registriert worden, wovon 22% der intensivstationären Patienten ein Multiorganversagen (engl. *multiple organ failure*, MOF) erlitten.

Das Immunsystem reagiert auf Traumageschehen und Gewebeverletzung mit einer Entzündungsreaktion, alarmiert mittels körpereigener Mediatoren, welche zur Regeneration und Wiederinstandsetzung verletzen Gewebes beitragen. Mittels proinflammatorischer Mechanismen wird eine sterile Hyperinflammation des Organismus eingeleitet (engl. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) [290, 291], welche parallel durch eine kontraregulierende antiinflammatorische Immunantwort (engl. *compensatory antiinflammatory response syndrome*; CARS) begleitet wird [292, 293]. Auf Ebene der Leukozyten-Transkription findet die Expression inflammatorischer und antiinflammatorischer Gene simultan statt [294]. Im ungünstigsten Fall manifestiert sich eine Dysregulation dieser Komplikationssyndrome (SIRS und CARS) schwerverletzter Patienten in einer Immunparalyse, die eine Infektanfälligkeit vermittelt bis hin zu einem MOF[295-298].

MATZINGER beschreibt diese beteiligten körpereigenen Entzündungsmediatoren der Immunantwort auf Traumata in ihrem „Dangermodell“ als *damage associated molecular patterns* (DAMPs) [299]. Die Immunologische Aktivierung von Prozessen der Pathogenabwehr, Gewebereparatur und -regeneration über *damage associated molecular patterns* läuft rezeptorabhängig analog der PAMP-Erkennung mittels PRRs. Sie stimulieren über z.B. TLR die Bildung von proinflammatorischen Mediatoren [300-306]. *Damage associated molecular patterns* sind eine heterogene Gruppe an Moleküle, dazugehörig auch die Subpopulation an Alarminen nach OPPENHEIM [307, 308], die von Zellen aktiv in sterilen wie auch infektiösen Stresssituationen oder passiv während Nekrose und Apoptose freigesetzt werden [309-312]. Proinflammatorische wirkende *damage associated molecular patterns* sind beispielsweise *high-mobility group box-1 protein* (HMBG-1) [313], IL-1 $\alpha$  [314], IL-33 [315], Ca-bindende Proteine (S100A8/ S100A9) [316], *heat shock proteins* (HSPs) [317], Akute-Phase, und Hormone (Adrenalin, Cortisol, Glucagon) [290], wobei z.B. Ubiquitin und HSP70 auch eine inhibitorische Wirkung aufweisen können [318].

Auf immunologischer Ebene führt eine Entgleisung der Entzündungsmechanismen nach Trauma, mit einer hohen Anzahl an lokal und systemisch vorkommenden *damage associated molecular patterns*, zu einer destruktiven Umwelt des Gewebes mit schädigender Wirkung durch z.B. übermäßigen Induktion von Apoptose [319,

320], Endothelschäden in Zusammenhang mit akkumulierten neutrophilen Granulozyten [321] und Entwicklung einer Disseminierten Intravasalen Gerinnungsstörung (lat. *disseminare* „verstreut“; lat. *intravasal* „im Gefäß“; engl. *disseminated intravascular coagulation*, DIC) [322]. Das Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2- Zellen, verschiebt sich langsam in Richtung T<sub>H</sub>2 durch Zunahme an antiinflammatorischen T<sub>H</sub>2- Zytokinen, wie IL- 4, IL- 5 und IL- 10, einhergehend mit verminderter IFN-  $\gamma$ - Produktion, wenn die Gegenregulation zur Hyperinflammation eintritt [323-325]. Die verminderte T<sub>H</sub>1-Antwort begünstigt Infektionen mit bakteriellen Erregern [125, 296, 326].

Anhand von neutrophilen Granulozyten, welche wichtig für eine effiziente Pathogenabwehr und Regeneration nach Gewebeschaden sind, konnte gezeigt werden, dass PMN- aktivierende Faktoren [327-329] und funktionelle Mechanismen nach Trauma deutlich erhöht bzw. modifiziert waren [160, 330, 331]. Die Überanzahl und -Aktivierung der PMNs sowie deren modifizierten Funktionsweisen, begünstigen (z.B. durch ROS- Bildung [332]) die Destruktion des involvierten Gewebes und können die Entwicklung von Organschäden forcieren [321].

---

### 2.3.1 PSEUDOMONAS- INFEKTION UND TRAUMA

---

In der Literatur werden Veränderungen im Immunsystem nach Trauma beschrieben (wie oben erwähnt), die zu einer Begünstigung von Infektionen mit sekundär infektiösen Erregern u.a. durch *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, P.a.) führen kann. Dieser Effekt konnte in Versuchsmodellen z.B. an Hand von Verbrennungen [333] beobachtet und reproduziert werden, aber es werden auch Effekte einer verbesserten Resistenzlage bzw. verbesserten immunologischen Abwehr nach partieller Verbrennung [334, 335] oder Lungenkontusion [336] geschildert. In der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass ein stumpfes Skelettmuskeltrauma in Mäusen eine verminderte Immunabwehr gegenüber Pseudomonaden induzierte (nicht publizierte Daten). Bestandteile von *P. aeruginosa* wie CpG, Flagellin, LPS oder Zellwand- Lipoproteine werden von TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9 des betroffenen Organismus erkannt und führen zu einem Entzündungsprozess in der Lunge, welche durch die Aktivierung des

Immunsystems moduliert wird [337-340]. Bei der Eliminierung der gram-negativen *Pseudomonas*-Bakterien in der Lunge kommen besonders Granulozyten und NK-Zellen eine entscheidende Funktion [341-344] zu, indem sie durch zytolytische, zytotoxische und zytokinsekretorische Effekte an der direkten Abwehr involviert sind. Eine Veränderung der Zellzusammensetzung in Bezug auf Granulozyten und NK-Zellen vor der *Pseudomonas*-Infektion kann einen direkten Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben. Durch z.B. Depletion von neutrophilen Granulozyten steigt die Mortalität infizierter Mäuse massiv an [345]. Der Einfluss von AMs auf den Infektionsverlauf mit *P. aeruginosa* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten zur *Pseudomonas*-Infektion in Kombination mit Depletion von AM wird von einer uneingeschränkten Bakterienbeseitigung berichtet ohne direkte Auswirkung auf die Mortalität von infizierten Tieren [346, 347], wohingegen in anderen Veröffentlichungen aber eine verminderte Zytokinsekretion, somit verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und verminderte Bakterienbeseitigung beschrieben wird [348-350]. Monozyten haben eine wichtige regulatorische Rolle bei Entzündungsprozessen in der Lunge wie z.B. die Überwachung der T-Zell-Antwort durch Rekrutierung aber auch Induktion von Apoptose zur Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion wie sie DAIGNEAULT und Mitarbeiter in einem Versuchsmodell mit *Streptococcus pneumoniae*-Bakterien beschreiben [351]. Allgemein sind Monozyten grundlegend an der antimikrobiellen Abwehr beteiligt u.a. durch Zytokinsekretion, Sekretion antimikrobieller Substanzen, Migration zur Infektionsstelle, und Differenzierung zu Makrophagen und DCs als Effektorzellen gegen Pathogene [352, 353]. Die Beteiligung von NKT-, T- und NK-Zellen an Infektionen mit *P. aeruginosa* wird in der Literatur u.a. über die Aktivierung der NKG2D-Rezeptor-Expression [341, 342] auf den Lymphozyten, zur Erkennung von veränderten oder infizierten Zellen, oder über die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 [354] beschrieben. Werden Lymphozyten in Infektionsmodellen mit *P. aeruginosa* depletiert [355], der NKG2D-Rezeptor blockiert oder ein IL-17-Antikörper eingesetzt, führt dies zu einer verminderten Bakterienbekämpfung, verminderten Zytokinproduktion und unzureichender Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Die Beteiligung von DCs mit ihrer Funktion als APCs an einer Infektion mit *P. aeruginosa* ist noch nicht weitläufig erforscht. In einem post-*caecal-ligation and puncture* (CLP)-

Mausmodell mit Transfer von DCs aus dem Knochenmark, scheinen DCs an der immunologischen Antwort auf die Infektion durch Regulation der Zytokinkonzentrationen von IL-10 und IL-12 teilzuhaben [276]. In einem Lungeninfektionsmodell mit *P. aeruginosa* von EPPERT und Mitarbeiter wird eine verbesserte proinflammatorische Immunabwehr mit erhöhter Bakterien-Beseitigung durch CCR7-Defizienz von DCs, Chemokinrezeptor auf T-, B-, und ausgereiften DCs, beschrieben [356].

---

### 2.3.2 ARDS/ ALI

---

Die Lunge ist mitunter das erste Organ [357-359], welches durch beeinträchtigte Immunfunktionen [360, 361] aufgrund von direkten oder indirekten Insulten heterogener Ätiologie wie z.B. Pneumonie, Aspiration, Lungenkontusion oder extrapulmonaler Sepsis, Trauma, Schock, Verbrennungen [362, 363], indirekt mitgeschädigt wird. Trotz vieler Studien ist es noch unklar wie genau es zu dieser Dysregulation des Immunsystems kommt und welche Mechanismen damit verbunden sind [362], v.a. in Anbetracht der unterschiedlichen Auswirkung jeder Traumaart auf die einzelnen immunologischen Bestandteile [364, 365]. In starker Ausprägung kann sich die immunologische Modulation in der Lunge als akutes progressives Lungenversagen (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) manifestieren. Der 1994 auf der amerikanischen-europäischen Konsenskonferenz (AECC) festgelegte Begriff ARDS [366] wurde 2011 von der *European Society of Intensive Care Medicine*, der *American Thoracic Society* und der *Society of Critical Care Medicine* neu definiert [367, 368] und der vorher eigenständige Begriff *acute lung injury* (ALI) mit ARDS gleichgesetzt. Nach der Definition des Konsensus in Berlin 2011, leiden Patienten dann an ARDS wenn die klinischen Symptome innerhalb einer Woche nach einer bekannten klinischen Erkrankung/ Verletzung aufgetreten sind bzw. sich neue oder verschlimmerte respiratorische Symptome hinzufügen, bilaterale Verschattungen (Infiltrate) der Lunge auf radiologischen definierten Thoraxaufnahmen gegeben sind ohne andere klinische Erklärung und unter definitivem Ausschluss kardialer Ursachen, es sich um ein respiratorisches Versagen ohne Herzversagen oder Hypervolämie handelt und die Oxygenierung des Blutes bei einem positiven endexpiratorischen Druck (engl. *positive end-expiratory*

*pressure*, PEEP) von einem Wert größer/ gleich 10 cmH<sub>2</sub>O liegt. Eingeteilt wird das ARDS nach der arteriellen Hypoxämie mit dem Horovitz- Quotienten (arterieller Sauerstoffpartialdruck/ inspiratorischen Sauerstoffkonzentration; PaO<sub>2</sub>/ FIO<sub>2</sub>) in die Abstufungen mild (201 bis 300 mmHg), moderat (< 200 mmHg), und schwer (< 100 mmHg). Nach der früheren AECC- Definition, wurden Patienten mit einer milden Hypoxämie (PaO<sub>2</sub>/ FIO<sub>2</sub> < 300mmHg bis > 200 mmHg) der Kategorie ALI zugeteilt und Patienten mit einer schweren Hypoxämie (PaO<sub>2</sub>/ FIO<sub>2</sub> <200 mmHg) der Kategorie ARDS [362, 366].

Pathophysiologisch tritt ein ARDS durch hochgradige Schädigung des Lungenparenchyms auf, hervorgerufen durch einen entzündlichen Insult, welcher zu erhöhter Permeabilität mit folgendem interstitiellen und alveolarem Ödem führt [369], resultierend in verminderter Restkapazität der Lungenfunktion [370] und inadäquaten Gasaustausch. Charakteristische histologische Veränderungen der Lunge von ARDS-Patienten sind hochgradige Akkumulation von Entzündungszellen v.a. aktivierten PMNs, diffuse Alveolarschädigungen einschließlich Verlust der epithelialen Integrität und freigelegter Basalmembran, abnormal verdickte Alveolarwände, pulmonale Ödematisierung, Fibrinanreicherungen und intravaskuläre Mikrothromben [371-374]. Die posttraumatische Aktivierung systemischer Entzündungsmediatoren über proinflammatorische Mechanismen scheint an der Entwicklung von traumaassoziierten, indirekten ARDS beteiligt zu sein [375-377]. In der folgenden Abb. 2.10 werden die entzündlichen Veränderungen in der Alveole während der akuten Phase des ARDS im Vergleich zu dem physiologischen Alveolar- Milieu dargestellt.



Die hochgradige Sequestrierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge kann durch deren proteolytischen Enzymen, Bildung von ROS und verringerter Apoptose zu erweiterten Schäden des Lungengewebes und generell zur Verschlechterung des pulmonalen Zustandes führen [379-382]. Experimentell erwies sich die Unterdrückung der PMN- Akkumulation in der Lunge z.B. durch Depletion von PMNs oder CXCR2- Blockade als positiv für den Ausgang eines ARDS durch verminderte Lungenschäden [359, 383-385]. Neutrophile Granulozyten sind Co- Mediatoren von ARDS, jedoch wird ARDS auch in Patienten mit Neutropenie beschrieben [386, 387] und PMN- Influx in die Lunge ohne erweiterten Lungenschaden [388, 389]. Somit ist die Kombination der PMN- Akkumulation mit anderen prädisponierenden Faktoren wie eine nicht- intakte epitheliale Barriere [371, 390], Apoptose von Epithelzellen über Fas/ FasL [391, 392], Stickoxid- Freisetzung von Makrophagen [393] oder veränderte endotheliale Struktur [372, 394] mitverantwortlich für die Schädigung des Lungengewebes und der Entwicklung von ARDS. Aber auch Faktoren wie in die Lunge infiltrierte T- Zellen oder aktivierte DCs nehmen regulatorischen Einfluss auf die Entwicklung von ARDS z.B. indem  $CD4^+ CD25^+ FOXP_3^+ T_{reg}s$  durch IL- 10- Sekretion zu einer verminderten PMN- Rekrutierung beitragen [395, 396] oder DCs zu einer Inhibierung der Einwanderung von proinflammatorischen Monozyten in die Lunge führen [397] und somit entzündliche Geschehen reduzieren.

## 2.4 ZIELE DER ARBEIT

---

Schwerverletzte Patienten haben ein hohes Risiko aufgrund von traumainduzierten immunmodulatorischen Mechanismen ein *Multiorganversagen*, unter anderem auch der Lunge als ARDS, zu erleiden [291, 292, 398]. Zusätzlich erhöht sich die Gefahr von infektiösen Komplikation durch Eintreten einer Immunsuppression und ggf. Immunparalyse [399-401]. Die Ursache dafür findet sich in einer möglichen Fehlkompensation der eingeleiteten, systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome*) durch die gegenregulierenden, antiinflammatorischen Mechanismen des CARS. Die Behandlung der Intensivpatienten wird durch die heterogenen Auswirkungen der verschiedenen Traumatypen auf das Immunsystem sowie das trotz wissenschaftlicher Fortschritte

begrenzte Wissen um die Vorgänge der Immunmodulation deutlich erschwert [365, 402, 403]. Schon einzelne Traumata mit geringerer Mortalität (Fraktur, Hämorrhagischer Schock, Verbrennungen) verändern die immunologischen Homöostase und können zu einer Vorprägung mit Gedächtnisbildung der Immunzellen (engl. *Priming*) des angeborenen und adaptiven Immunsystems führen, welche durch sekundäre Geschehen (engl. *second hit*) wie z.B. Infektionen zu einer hochgradigen Dysregulation des Immunsystems führen, bis hin zum Tod des Patienten [359, 360, 379, 404, 405]. Das Verständnis, durch welche komplexen Vorgänge im Einzelnen eine Immunmodulation zu Stande kommen und welche Auswirkungen sie auf den Organismus haben kann, ist wichtig zur Optimierung der medizinischen Versorgung von Risikopatienten und zur Definition kompetenter Therapiekonzepte und Behandlungsmethoden wie z.B. vermindertes Beatmungsvolumen in der künstlichen Beatmung bei ARDS-Risikopatienten [406, 407]. Bekanntermaßen führen Skelettmuskeltraumata, welche mit fast allen Operationen und Unfällen einhergehen [318, 403, 408], zu einer veränderten Immunlage im betroffenen Gewebe und es kommt zur Initiation einer Entzündungsreaktion [405, 409, 410]. An diesen muskelinflammatorischen sowie regenerativen Prozessen sind zelluläre Bestandteile wie residente Makrophagen, infiltrierende PMNs, DCs, Monozyten aber auch Mast- und T-Zellen [411-414] sowie humorale Mediatoren z.B. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 [415, 416] des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems beteiligt. Inwieweit sich diese Prozesse, induziert durch ein stumpfes Weichteiltrauma, auch auf andere Organe wie z.B. die Lunge ausweiten und welche Auswirkungen sie haben, ist z.Z. noch weitgehend unbekannt.

Es ist essentiell, die lokalen und systemischen immunologischen Auswirkungen stumpfer Skelettmuskeltraumata zu charakterisieren, um mögliche inflammatorische oder immunsuppressive Komplikation nach Operationen und Traumata verstehen zu lernen. Diese Arbeit soll mittels eines Mausmodells zu einem ersten Überblick über die immunologische Homöostase von Immunzellen sowie über die humoralen Immunmediatoren und immunmodulatorischen Effekte in der Lunge nach Induktion eines Weichteiltraumas auf die *Gastrocnemius*-Muskulatur beider Hinterbeine von Mäusen verhelfen. Dazu werden murine Zellen hauptsächlich aus der Lunge und dem Blut isoliert und auf ihre Zusammensetzung untersucht sowie die Zytokinmuster mittels Durchflusszytometer und ELISA analysiert. Der Einfluss einer

Sekundärinfektion auf das Immunsystem der Lunge wird mit Hilfe einer intranasalen (i.n.) Instillation von *P. aeruginosa* als typischem Hospitalismuskeim ermittelt.

## 3 MATERIAL

### 3.1 VERBRAUCHSMATERIAL

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien beispielsweise Zellkulturplatten, Pipetten, PP- Schraubenverschlussröhrchen, Pipettenspitzen, Kanülen, Einmalspritzen, Zellsiebe und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Falcon BD (Heidelberg), Becton, Dickinson and Company BD (Heidelberg), STARLAB (Ahrensburg), Greiner bio- one (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) erworben.

### 3.2 LABOR- GERÄTE

Die in Tabelle (Tab.) 3.1 aufgelisteten Geräte, wurden für die Arbeiten im Labor verwendet.

**Tab. 3.1 Verwendete Geräte**

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Auflichtmikroskop AxioStar plus	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
CO <sub>2</sub> Inkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer FACSCalibur®	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Mikroplatten- Absorptionsreader ELx808	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Spektrometer DR/2010	HACH LANGE GmbH, Düsseldorf
Werkbank antair BSK	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Zentrifuge Varifuge 3.0RS	Heraeus, München
Zentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, München
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

### 3.3 CHEMIKALIEN

Von den Firmen Sigma Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) wurden alle verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen. Von der hauseigenen Apotheke des Universitätsklinikums Essen wurde das zur Desinfektion verwendete Ethanol gestellt.

## 3.4 PUFFER, LÖSUNGEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien der unter Kapitel 3.3 angegebenen Firmen zum Ansetzen der Puffer und Lösungen (s. Tab. 3.2) verwendet. Entionisiertes Wasser aus der hauseigenen Anlage, selbst angesetztes PBS (*phosphat- buffered saline*) oder *Aqua ad iniectabilia* (Braun, Melsungen) wurden als Lösungsmittel verwendet. Das in der Zellkultur eingesetzte PBS wurde von Gibco/ Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und besaß einen Endotoxingehalt von  $\leq 1$  EU/ml. Die Puffer und Lösungen zum Einsatz in der Zellkultur wurden vor Gebrauch mit einem 0,22  $\mu\text{m}$  Filter steril filtriert.

Tab. 3.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Blockierlösung (für ELISA)	1 % FCS in PBS
Cellwash <sup>®</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Cytoperm/ Cytifix <sup>®</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
EDTA	250 mM Stocklösung
ELISA- Waschpuffer	D- PBS + 0,05 % Tween- 20
Erythrozyten- Lysepuffer, pH 7	0,15 M $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 10 mM $\text{KHCO}_3$ ; 0,1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Ethanol	100% v/v, Apotheke Universitätsklinikum Essen
D- PBS (für ELISA)	1,5 M $\text{NaCl}$ ; 26,8 mM $\text{KCl}$ ; 14,7 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 27,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	100% v/v, Abott, Wiesbaden
Ketamin	CEVA, Sante Animal, Düsseldorf
Physiologische Trypanblaulösung	0,4 %, Sigma- Aldrich, Taufkirchen
<i>TMB Substrat Reagent Set</i>	BD OptEIA <sup>™</sup> , BD Biosciences, Heidelberg
Xylazin	CEVA, Sante Animal, Düsseldorf

### 3.5 REAGENZIEN, ZYTOKINE, STIMULI UND BAKTERIEN

#### 3.5.1 REANGENZIEN, ZYTOKINE UND STIMULI

Die Reagenzien, Zytokine und Stimuli, die unter Tab. 3.3 aufgeführten sind, fanden Anwendung in der Kultivierung und Aufreinigung von Zellen oder wurden *in vivo* in Versuchstiere appliziert. Sie wurden von den genannten Herstellern bezogen.

**Tab. 3.3 Reagenzien und Stimuli**

Reagenz	Bezugsquelle
Anti-Asialo GM1 Antiserum	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Collagenase P (Clostridopeptidase A, EC 3.4.24.3.)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dihydrorhodamine 123	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Liberase Blendzym 2	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Monensin (GolgiStop™)	BD Biosciences, Heidelberg
Zytokin	Bezugsquelle
Rekombinantes murines IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
Stimulus	Bezugsquelle
Concanavalin A (Con A)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
CpG- Oligonukleotide (Sequenz: T*C*C*ATGACGTTCCCTGAT*G*C*T)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Lipopolysaccharid (LPS, <i>E.coli</i> 026:B6)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen

#### 3.5.2 BAKTERIEN

Der *Pseudomonas aeruginosa* Bakterienstamm ATCC 27853 wurde von PROF. DR. GULBINS (Universitätsklinikum Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Pseudomonaden wurden mit Ultraviolettstrahlung (UV)- inaktiviert und zur intranasalen (i.n.) Infektion von Versuchstieren verwendet. Die UV- inaktivierten Bakterien fanden zusätzlich Anwendung bei der *in vitro* Stimulation von Zellkulturen muriner Zelltypen.

## 3.6 SEREN UND MEDIEN

---

### 3.6.1 SEREN

---

In der Zellkultur wurde fötales Kälber Serum (engl. *fetal calf serum*, FCS) der Firma Biochrom (Berlin) als Mediensersatz verwendet. Es besaß einen geringen Endotoxingehalt von weniger als 1,00 EU/ml. Vor der Anwendung wurde das FCS zur Komplementinaktivierung 30 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt und danach 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Nach Trennung von den sedimentierten Bestandteilen wurde es in 50 ml Portionen bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

Zur Gewinnung von Kaninchen- und Mausserum wurde Spendertieren Blut ohne Zusatz von Antikoagulanzen abgenommen und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Blutabnahme bei Kaninchen erfolgte am Ohr über die *Vena auricularis* und bei der Maus unter Allgemeinanästhesie entweder retrobulbär durch Punktion des *Plexus ophthalmicus* oder durch Herzpunktion. Nach Abschluss der Koagulation und Zentrifugation wurde das Serum als Überstand über dem koagulierten Blutkuchen abgenommen. Das gewonnene Serum wurde in einem Volumen von 500 µl (Kaninchen) oder 150- 200 µl (Maus) aliquotiert und bei -20 °C verwahrt. Eine Hitze-Inaktivierung des Kaninchen- sowie Mäuseserums erfolgte nicht. Das Kaninchenserum stammte von einem naiven Kaninchen des Zentralen Tierlabors (ZTL) des Uniklinikums Essen. Das verwendete Mausblut wurde Mäusen der Kontroll- und der Traumagruppe während der Versuchsreihen abgenommen.

### 3.6.2 KULTURMEDIUM

---

Das *very low endotoxin medium* (VLE) RPMI 1640 der Firma Biochrom (Berlin) wurde für alle Ansätze von Zellkulturen und Arbeiten mit murinen Zellen als Kulturmedium verwendet. Als endotoxinfreie Zusätze wurden dem Kulturmedium 10 mM HEPES (Biochrom, Berlin), 2 mM L- Glutamin (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 0,06 mg/ml Penicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 0,02 mg/ml Gentamycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 0,05 mM  $\beta$ - Mercaptoethanol zugesetzt. Dem Medium wurde zur Kultivierung zusätzlich noch 10 % Hitze- inaktiviertes FCS beigegeben.

## 3.7 ANTIKÖRPER

## 3.7.1 ANTIKÖRPER ZUR DURCHFLUSSZYTOMETRISCHEN ANALYSE

Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen wurden für die Analyse von Zellen bezüglich ihrer Oberflächenrezeptoren und für die Bestimmung von intrazellulären Zytokinen mittels Durchflusszytometrie verwendet. In Tab. 3.4 sind die jeweilige Bezugsquelle, Farbstoff- Konjugation, Isotyp und Klon, aus dem die Antikörper generiert wurden, aufgeführt. Es werden nur die Isotypen angegeben, welche in der durchflusszytometrischen Messung verwendet wurden. Die Abkürzung FITC steht für Fluoresceinisothiocyanat, PE für Phycoerythrin, PerCPCy5.5 für Phycoerythrin Cyanin und APC für Allophycocyanin.

Tab. 3.4 Antikörper

Konjugation	Spezifität	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
<b>FITC</b>				
	CD3e	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg	
	I-A/I-E	2G9	BD Biosciences, Heidelberg	
	Ly6C	AL-21	BD Biosciences, Heidelberg	
<b>PE</b>				
	B220/CD45R	RA3-6B2	BD Biosciences, Heidelberg	
	CD69	H1.2F3	BD Biosciences, Heidelberg	
	IFN- $\gamma$	XMG1.2	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG1, $\kappa$
	IL-12	C15.6	BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG1
	Ly6G	1A8	BD Biosciences, Heidelberg	
<b>PerCPCy5.5</b>				
	CD11b	M1/70	BD Biosciences, Heidelberg	
<b>APC</b>				
	CD11c	N418	BD Biosciences, Heidelberg	
	CD49b	DX5	eBioscience, Frankfurt	

### 3.7.2 ANTIKÖRPER ZUR BESTIMMUNG VON ZY TOKINKONZENTRATIONEN

Die in der Tab. 3.5 aufgelisteten Antikörper wurden als kommerzielle Standardtests verwendet und dienten der Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

**Tab. 3.5 ELISA- Test- Kits**

Test-Kit	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper	Bezugsquelle
<i>mouse</i> IFN- $\gamma$ ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus IFN- $\gamma$	Ziege anti- Maus IFN- $\gamma$	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> IL- 1 $\beta$ ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus IL-1 $\beta$	Ziege anti- Maus IL-1 $\beta$	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> IL- 6 ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus IL- 6	Ziege anti- Maus IL- 6	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> IL- 10 ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus IL- 10	Ziege anti- Maus IL- 10	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> IL- 12p70 ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus IL- 12p70	Ziege anti- Maus IL- 12p70	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> CXCL1/ KC ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus KC	Ziege anti- Maus KC	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> CXCL2/ MIP-2 ELISA Duo Set	Ratte anti- Maus MIP-2	Ziege anti- Maus MIP-2	R&D Systems, Wiesbaden
<i>mouse</i> TNF- $\alpha$ ELISA Duo Set	Ziege anti- Maus TNF- $\alpha$	Ziege anti- Maus TNF- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden

### 3.8 VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden Mäuse vom Stamm BALB/c, MyD88<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2,4<sup>-/-</sup> auf BALB/c–Hintergrund, und in 2 Versuchen MyD88<sup>-/-</sup> auf C57BL/6–Hintergrund, verwendet. Bis auf die weiblichen Mäuse des Stamm MyD88<sup>-/-</sup> mit BALB/c-Hintergrund waren alle Tiere männlich. Die Mäuse vom Stamm BALB/c und C57BL/6 wurden von Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland erworben oder stammten, wie auch die MyD88<sup>-/-</sup>- Mäuse auf C57BL/6- Hintergrund, aus eigener Zucht. Wobei die Elterntiere der im ZTL des Universitätsklinikums Essen zur Zucht verwendeten Mäuse ursprünglich von Harlan Winkelmann (Borchon, Deutschland) bezogen worden waren. Die genetischen knock- out- Tiere MyD88<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, und TLR2,4<sup>-/-</sup> auf BALB/c– Hintergrund wurden mit freundlicher Genehmigung aus dem ZTL der Universität Orléans, Molecular Immunology and Embryology Transgenose Institute, Frankreich von Dr. B. RYFFEL gespendet. Erstmals erwähnt wurden die genetisch veränderten Mäuse des Types MyD88<sup>-/-</sup> von ADACHI und Mitarbeiter [417], TLR4<sup>-/-</sup> von HOSHINO *et al.* [418] und TLR2,4<sup>-/-</sup> von SEKI *et al.* [419]. Alle

Tiere waren zu Versuchsbeginn im Alter von zehn bis zwölf Wochen. Die extern d.h. nicht vom ZTL der Universitätsklinik Essen erworbenen Mäuse wurden frühestens 1 Woche nach Zugang in den Versuch aufgenommen. Dies ermöglichte es den Tieren sich an die Umgebungsbedingungen zu gewöhnen und sich von möglichem Transportstress zu erholen. Die Versuchstiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen im ZTL des Universitätsklinikums Essen gehalten und hatten Zugang zu Standard- Nagerfutter und Wasser *ad libidum*.

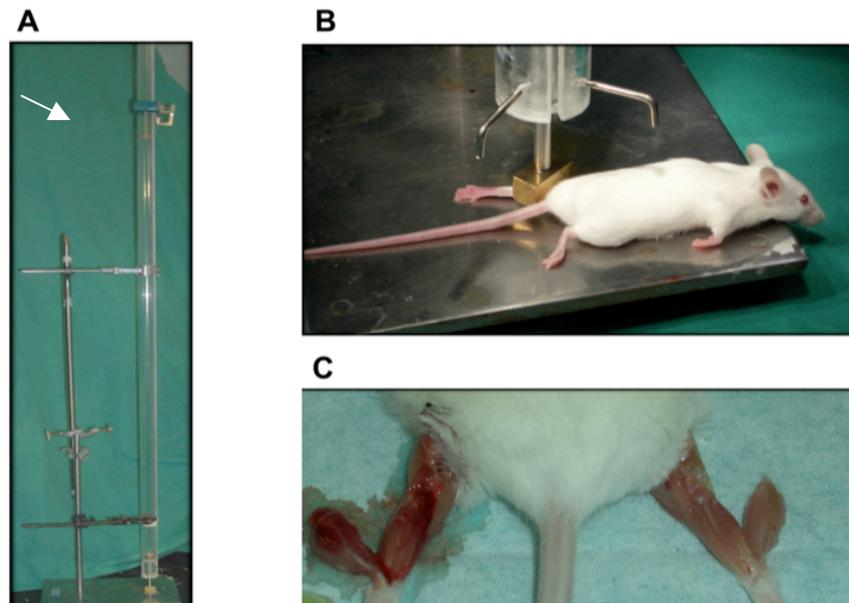
## 4 METHODEN

---

### 4.1 TIERMODELL ZUR INDUKTION EINES WEICHTEILTRAUMAS BEI DER MAUS

---

Das für diese Arbeit verwendete Tierversuchsmodell lief unter der genehmigten Tierschutzanzeige mit dem Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.288. Um die Wirkung eines lokal begrenzten Weichteiltrauma auf die Lunge zu untersuchen, wurde das im Original von CRISCO und Mitarbeiter [420] stammende Traumamodell angewendet und in diesem Labor auf die Maus adaptiert wie etabliert. Hierbei wird eine geschlossene Verletzung der Wadenmuskulatur induziert, ohne eine Fraktur zu erzeugen. Die Narkose der Versuchstiere wurde über eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und einer einmaligen intramuskulären (i.m.) Injektion von 57,5 mg/ kg Körpergewicht Ketamin und 6,5 mg/ kg Körpergewicht Xylazin (CEVA, Sante Animal, Düsseldorf) eingeleitet. In einer Mischspritze wurden Ketamin und Xylazin mit 0,9 % iger NaCl- Lösung verdünnt und in einem Volumen von 50 µl in den rechten Vorderlauf i.m. injiziert. Zur Narkoseerhaltung wurde bei Bedarf wenn die gewünschte Narkosetiefe nicht erreicht wurde bis zu 25 µl der verdünnten Ketamin/ Xylazin- Lösung nachinjiziert. Das Muskeltrauma erfolgte auf dem zweiköpfigen Wadenmuskel (lat. *musculus gastrocnemius*, *M. gastrocnemius*) beider Hinterbeine der narkotisierten Maus. In der Durchführung wurde die Maus zuerst in Sternallage positioniert und ein Stempel auf den Wadenmuskel aufgesetzt. In der Apparatur der Traumasäule wurde ein Gewicht von 20 g in einer Fallhöhe von 120 cm fixiert und dann geführt in einer Plexiglasröhre auf den Stempel fallengelassen. Die Energie des Aufpralls des Fallgewichts übertrug sich auf den Stempel und induzierte ein reproduzierbares und auf den *M. gastrocnemius* lokal begrenztes stumpfes Weichteiltrauma (s. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1 Induktion eines geschlossenen Weichteiltraumas.** **A** Fallröhre mit eingespanntem Gewicht (s. Pfeil) in 120 cm Höhe. **B** Narkotisiertes Versuchstier mit auf der Wadenmuskulatur platziertem Stempel zur Induktion des Traumas. **C** Dasselbe Versuchstier aus **B** nach Traumaapplikation in Sternallage mit anpräparierter Hinterbeinmuskulatur. Deutlich ist der traumatisierte Muskel links im Vergleich zu dem nicht-traumatisierten Muskel rechts zu erkennen.

Die Versuchstiere der Negativkontrollgruppe wurden wie oben beschrieben narkotisiert, aber es wurde kein Weichteiltrauma der Oberschenkel induziert. Je Versuchsdurchführung wurden mindestens drei Mäuse einem Trauma unterzogen und mindestens drei Mäuse dienten als Narkosekontrolle. Die Tiere wurden noch für mindestens eine halbe Stunde postanästhetisch überwacht. Während des gesamten Versuchszeitraums, der von einer Stunde bis sieben Tage variierte, waren die Tiere im ZTL des Universitätsklinikums Essen untergebracht.

## 4.2 APPLIKATIONEN, BLUT- UND ORGANENTNAHME

### 4.2.1 APPLIKATIONSARTEN

Die im Versuchsaufbau verwendeten Substanzen wurden den Versuchstieren i.n. appliziert oder i.m., intravenös (i.v.), oder intraperitoneal (i.p.) injiziert. Als Verdünnungslösung der verschiedenen Substanzen diente steriles PBS mit geringem Endotoxingehalt.

Bei i.v.- Applikation in die Schwanzvene wurde Serum von Versuchstieren drei Stunden nach Trauma bzw. Kontrollbehandlung gewonnen und in naive Mäuse transferiert. Zur besseren Darstellung der Schwanzvene wurden die Tiere in einer Plexiglasfalle fixiert und der Schwanz mit warmem Wasser angewärmt. Je nach Versuch wurde 100 µl oder 200 µl Serum i.v. injiziert.

Die i.n.- Applikation von UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien erfolgte in einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Kolonie- bildenden Einheiten (*colony- forming units*, CFU) in einem Gesamtvolumen von 20 µl PBS, aufgeteilt in je 10 µl pro Nasenloch. Die Kontrollgruppe erhielt 20 µl PBS i.n.. Die Tiere wurden zur erleichterten Applikation unter Kurznarkose mittels Isofluran in senkrechter Position fixiert.

Zur Untersuchung einer möglichen immunmodulierenden Rolle von NK- Zellen bei der Migration von Granulozyten in die Lunge wurden den Versuchstieren einen Tag vor Trauma 50 µl Anti- Asialo GM1 Antiserum i.p. injiziert. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielten 50 µl eines Kaninchenserums, welches ebenfalls i.p. verabreicht wurden. Bei dem Anti- Asialo- Serum handelt es sich um ein Serum, das aus Kaninchen gewonnen wird und das die Aktivität von NK- Zellen in verschiedenen Ratten- und Maus- Stämmen eliminiert. Das mit Salzen lyophilisiert vorliegende Serum wurde nach den Angaben des Herstellers in 1 ml destilliertem Wasser gelöst.

Intramuskulär wurden Ketamin und Xylazin zur Einleitung der Narkose und Narkoseerhaltung, wie unter Kapitel 4.1 beschrieben, in die Oberarmmuskulatur der Mäuse injiziert bevor dann das Trauma induziert wurde, während die Negativkontrolle ohne die letzte Behandlung blieb.

---

#### 4.2.2 BLUTENTNAHME

---

Vollblut wurde den Versuchstieren unter kurzer Vollnarkose mittels Isofluran entweder durch intraorbitale Punktion des retrobulbären Venenplexus oder durch die intracardiale Punktion des Herzens entnommen. Bei der intraorbitalen Blutentnahme wurde die *V. jugularis* durch Nackengriff gestaut und der Venenplexus über den Zugang durch den medialen Augenwinkel mit einer Blutkapillare von 0,8 mm Außendurchmesser punktiert. Um eine intrakardiale Punktion des Herzens

durchzuführen, wurden die Tiere in Rückenlage verbracht, von caudal unterhalb des Xyphoid parallel zu Längsachse mit einer 35 Gauge (G) Kanüle (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) in den Thorax eingegangen und das Herz punktiert. Bis zu 1 ml Blut wurde in eine heparinisierte 1 ml Spritze aspiriert. Ein Teil des gewonnenen Bluts wurde in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blutentnahmeröhrchen zur durchflusszytometrischen Analyse aufgefangen und der jeweils andere Teil zur Serumgewinnung (siehe auch Kapitel 3.6.1) genutzt.

Die Blutgewinnung wurde nach der „Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren“ [421] des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte in der GV- SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT durchgeführt. Bei beiden Blutgewinnungsarten befanden sich die Versuchstiere in einer Kurznarkose mittels Isofluran. Es konnte pro Maus bis zu 1 ml Blut entnommen werden.

---

#### 4.2.3 ORGANENTNAHME

---

Zur Extirpation der Organe wie Lunge, Milz, Lymphknoten und Muskeln wurden die Versuchstiere nach Betäubung mittels Isofluran durch zervikale Dislokation getötet. Hiernach folgten alle weiteren Arbeitsschritte zur Organentnahme unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank.

##### 4.2.3.1 PRÄPARATION DER MILZ

---

Um eine Splenektomie durchzuführen, wurden die Versuchstiere in linker Seitenlage fixiert und das Präparationsfeldes mit 70 % igem Ethanol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Hautinzision auf der linken Körperseite im Bereich der Milz mit Hilfe einer sterilen Schere durchgeführt. Zum Eröffnen des Peritoneums wurde das Sezierbesteck gewechselt und die Milz in der Bauchhöhle von umliegendem Fett, Netz und Blutgefäßen unter Verwendung einer Schere und stumpfen Pinzette freipräpariert. Nach der vollständigen Entnahme der Milz aus dem Abdomen wurde diese bis zur Zellgewinnung in eine Petrischale (100 x 15 mm, Falcon, BD Biosciences), gefüllt mit FCS- haltigem Kulturmedium, überführt.

#### 4.2.3.2 PRÄPARATION DER MUSKELN

---

Zur Präparation des *M. gastrocnemius* wurden die hinteren Extremitäten der Versuchstiere mit 70 % igem Ethanol desinfiziert. Die Haut wurde im gesamten Bereich der Hinterbeine mit Hilfe einer Schere und Pinzette entfernt und die *Gastrocnemius*- Muskulatur beider Hinterbeinen der Maus abgetrennt. Die präparierten Muskeln wurden sofort weiterbehandelt zur Isolation der Muskelzellen.

#### 4.2.3.3 PRÄPARATION DER LUNGE

---

Die Versuchstiere wurden zur Entfernung der Lunge in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion des Thorax- und Abdominalbereiches wurde mittels einer sterilen Schere eine Hautinzision entlang der *Linea alba* über den Thorax bis zum Larynx durchgeführt um Thorax sowie Abdomen freizulegen. Zur Eröffnung des Peritoneums wurde einer zweite Schere angewendet, mit der auch im weiteren Verlauf das Diaphragma durchtrennt und der vordere Anteil des Brustkorbes mittels Kostotomie entfernt wurde. Nach Durchtrennung der *V. cava caudalis* und der Aorta zur Druckentlastung, wurde die Lunge gespült. Hierzu wurde das Herz im *Ventrikulus dexter* mit einer 22 G Kanüle (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) punktiert und unter leichtem Druck mit 2 – 3 ml einer eiskalten, sterilen PBS- Lösung aus einer 10 ml Spritze gespült, bis sich beide Lungenflügel adspektorisch weiß verfärbten. Das sich in der Lunge befindende Blut konnte über die durchtrennte Aorta im Bauchraum ablaufen. Die Lunge wurde mit einer Schere und einer anatomischen Pinzette von der Trachea und den Lungengefäßen getrennt und dem Brustkorb entnommen. Die präparierten Lungenflügel wurden sofort weiterbehandelt zur Aufreinigung der Lungenzellen.

#### 4.2.3.4 PRÄPARATION DER LYMPHKNOTEN

---

Lymphknotenzellen (LNC) wurden aus den cervicalen, inguinalen und poplitealen Lymphknoten (Lnn.) isoliert. Zur Entfernung der *Lnn. popliteales*, welche sich eingebettet in Fettgewebe der Kniekehle befinden, wurde die Maus in ventro-dorsale- Lage platziert und die Präparationsfelder mit 70 % igem Ethanol desinfiziert. Dann wurden die Hinterläufe in gespreizter Haltung nach lateral fixiert, die Haut im

Innenschenkel von proximal nach distal über das Kniegelenk hinaus mit einer sterilen Schere durchgeschnitten, von den Muskeln getrennt und nach caudal fixiert. Im Anschluss an die Entfernung der Kniekehlymphknoten wurde das Versuchstier in Rückenlage umgelagert und erneut im Bereich der Präparationsfelder desinfiziert. Es erfolgte eine Inzision der Haut entlang der *Linea alba* über den Thorax und Kehlkopf hinaus, um dann die Haut nach lateral zu fixieren und die inguinalen Lymphknoten zu rezieren. Zur Entfernung der cervicalen Lymphknoten wurde der Kopf des Versuchstieres überstreckt und die Haut entfernt. Nach vorsichtiger Präparation der Halseingeweide wurden die *Lnn. cervicales* entfernt. Zur Durchführung der Präparation der Lymphknoten wurde das Besteck jeweils nach den Hautschnitten gewechselt.

Alle Lymphknoten einer Versuchsgruppe (Kontrolle, Trauma) und anatomischen Lage (cervical, inguinal, popliteal) wurden in einer Petrischale (60 x 15 mm, Falcon, BD Biosciences) mit Kulturmedium gepoolt.

### 4.3 ZELLKULTUR

---

Die Durchführung jeglicher Arbeitsschritte zur Isolierung und Kultivierung der verschiedenen murinen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank. In den Zwischenphasen der einzelnen Arbeitsschritte wurden die isolierten Organe, Gewebe bzw. Zellen auf Eis gekühlt. Die Inkubation der Zellpräparate fand bei 37 °C in einem Brutschrank mit einem 5 % igem CO<sub>2</sub>- Gas-Luft- Gemisch und wasserdampfgesättigter Atmosphäre statt.

#### 4.3.1 ERYTHROZYTEN- LYSE

---

Zur Lyse der restlich vorhandenen Erythrozyten aus den gewonnen Zellgemischen von Milz und Lunge wurden die unbehandelten Zellen zuerst 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet organabhängig in 1 ml (Lunge) oder 2 ml (Milz) Erythrozyten- Lysepuffer re- suspendiert und bei RT für 1 min inkubiert. Der Lysevorgang wurde durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium beendet und zur

Trennung der Erythrozyten von den restlichen Zellen erfolgte eine Unterschichtung mit 2 ml FCS. Nach einer weiteren Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) wurde das Zellsediment zur weiteren Bearbeitung in Kulturmedium aufgenommen.

---

#### 4.3.2 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON MILZZELLEN

---

Um Milzzellen isolieren zu können, wurde 1 ml Liberase Blendzyme 2 mit einer Konzentration von 4 µg/ml zur Auflösung der Zellverbände mit Hilfe einer 27 G Nadel (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) und einer Spritze verteilt an drei Stellen in die nach Kapitel 4.2.3.1 resizierte Milz injiziert. Liberase Blendzyme 2 ist ein Enzymgemisch zum effizienten und vorsichtigen Aufschluss des Gewebes durch Wirkung auf die Kollagene und nicht-Kollagen-Proteine der intrazellulären Matrix des Milzgewebes. Zur enzymatischen Aufspaltung folgte eine Teilung des Organs in drei vergleichbar große Stücke, welche dann für 18 Minuten in Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Hiernach wurde die Milz, in dissoziierter Form, mit dem Stempel einer sterilen 2 ml Spritze durch ein Zellsieb (70 µm, BD Biosciences) in eine Petrischale gerieben und resuspendiert. In der Petrischale war ein Gemisch aus 20 ml Kulturmedium und 5 mM EDTA vorgelegt, welches zur Dissoziation von Zell-Clustern diente. Die Milzzellen wurden durch ein weiteres Zellsieb (40 µm, BD Biosciences) zur Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) und anschließender Erythrozyten-Lyse in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Nach Lyse der Erythrozyten und weiterer Zentrifugation, wurde das Pellet aus Milzzellen in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde nach Verdünnung der Zellen im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Im Anschluss an die Isolierung wurden die Zellen aus der Milz 24 Stunden zur Intrazellulärfärbung oder 48 Stunden zur Gewinnung des Überstandes für die Zytokinbestimmung mittels ELISA in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen und einem Volumen von 200 µl in vierfacher Ausführung in einer 96 well Flachbodenplatten ausgesät. Eine Kultivierung mit 5 µg/ml Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) fand zur Intrazellulärfärbung für die durchflusszytometrischen Messung statt und die Stimulation durch 3 µg/ml Concanavalin A (ConA) wurde zur Zytokinbestimmung

mittels ELISA angewendet. ConA ist ein Metalloprotein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) und gehört zu den Lektinen, da es membranständige Kohlenhydratstrukturen auf verschiedenen Zellen binden kann. Hierdurch kann es sich an Zellen heften und biochemische Reaktionen auslösen, aber ohne dass eine Enzymaktivität besteht. Es wirkt als Mitogen und kann T- Lymphozyten stimulieren. CpG ist eine bakterielle Komponenten zur Stimulation von immunologisch aktiven Zellen. Kulturmedium wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung wurden  $8 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt.

---

#### 4.3.3 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON MUSKELZELLEN

---

Die isolierten *Gastrocnemius*- Muskeln wurden auf einem Objektträger mit Hilfe eines Skalpell weitmöglich zerkleinert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach Verdau mit 1 ml Liberase Blendzyme 2 (4  $\mu$ l/ ml) für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C wurden die Muskelfragmente durch ein 40  $\mu$ m Zellsieb gerieben. Das erhaltene Zellgemisch wurde zentrifugiert (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C), in Medium aufgenommen und nochmals durch einen Zellfilter (30  $\mu$ m, MACS Pre- Separation Filter, Miltenyi Biotec) in ein 15 ml Falconröhrchen filtriert. Zum Abschluss wurden die Zellen noch einmal gewaschen um dann zur durchflusszytometrischen Färbung in 2 ml PBS aufgenommen zu werden.

---

#### 4.3.4 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON LUNGENZELLEN

---

Zur Gewinnung der Lungenzellen wurde die entnommene Lunge mit einem Einmalskalpell auf einem Objektträger zerkleinert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, in welchem 3 ml einer 2 mg/ ml Collagenase P- PBS- Lösung vorgelegt waren. Collagenase P ist eine Mischung aus Enzymen, gewonnen aus dem Überstand von *Clostridium histolyticum*- Kulturen, zum Aufschluss von Gewebeverbänden und zur Isolierung von Zellen. Nach der Inkubation der Lunge zur enzymatischen Aufspaltung im Wasserbad für 45 min bei 37 °C wurden die zersetzten Lungenfragmente durch intensives Vortexen aufgeschüttelt und mit dem

Stempel einer 2 ml Spritze durch ein 40 µm Zellsieb (BD Biosciences) gerieben und zum Erhalt des größtmöglichen Zellanteils mit der erforderlichen Menge an PBS nachgespült. Zur Minimierung von Debris in der Zellsuspension fand eine Filtrierung durch einen Nylonfilter (30 µm Maschenstärke, BD Biosciences) in ein 15 ml Falconröhrchen mit anschließender Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) statt. Nach der folgenden Erythrozyten-Lyse, wurden die Lungenzellen in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer in einer 1:10 Verdünnung der Zellen mit Trypanblau (Biochrom AG, Berlin) unter dem Mikroskop ermittelt.

$8 \times 10^5$  Zellen wurden für die durchflusszytometrische Bestimmung pro Färbung eingesetzt. Bei Anwendung einer Intrazellulärfärbung fand erst eine Kultivierung der Lungenzellen für 24 Stunden statt.

Zur Zellkultivierung wurden die gewonnenen Zellen aus der Lunge ( $4 \times 10^5$  Zellen in 200 µl Kulturmedium/ well) in einer 96 well Rundbodenplatte ausgesät in der Regel als Triplikate maximal aber in fünffacher Ausführung, in einem Brutschrank bis zur Überstandabnahme 24 Stunden inkubiert. Nach der ersten Inkubationsstunde erfolgte eine Restimulation der Zellen mit 2 µl/ well ( $1 \times 10^9$  CFU/ ml) UV-inaktivierten *P. aeruginosa* unter Zusatz von 3 ng/ ml rIL-2 zur NK-Zell-Aktivierung und zu einem kleinerem Teil auch mit 3 µg/ ml ConA, 5 µg/ ml CpG oder 100 ng/ ml Lipopolysaccharid (LPS), welches zu den Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien gehört.

---

#### 4.3.5 ISOLIERUNG VON LYMPHKNOTENZELLEN

---

Um die LNCs aus den exzipierten Lymphknoten freizusetzen, wurde die kollagene Lymphknotenkapsel mit Hilfe von zwei 24 G Kanülen (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) eröffnet, die Matrix in eine Petrischale mit Kulturmedium ausgeschabt und die gewonnene Zellsuspension zur Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Abschließend wurden das gewonnene Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und die LNCs mittels einer Neubauer-Zählkammer, nach einer Verdünnung im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau, ausgezählt.

---

#### 4.3.6 BESTIMMUNG DER GESAMTZELLZAHL

---

Zum Einsatz der isolierten Zellen aus den einzelnen Organen wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer- Zählkammer und Trypanblau- Lösung unter einem Mikroskop ermittelt. Dazu wurde eine adäquate Menge an Zellsuspension in einer 1:10- Verdünnung mit Trypanblau- Lösung versetzt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher durch Blaufärbung toter Zellen zur Bestimmung der Zellviabilität (Zellebensfähigkeit, Lebendzellzahl) herangezogen werden kann. Die Zellmembran von lebenden Zellen ist für diesen Farbstoff undurchlässig. Die Zählkammer wurde mit der gefärbten Zellsuspension beschickt und die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmt. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, wurde dieser Wert mit dem Kulturvolumen multipliziert.

---

### 4.4 KOMMERZIELLE STANDARDTESTVERFAHREN

---

---

#### 4.4.1 FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

---

Die Abkürzung „FACS“ steht für eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson und bedeutet *fluorescence activated cell sorting*, Durchflusszytometrie. Dabei werden Lichtstreuung und Fluoreszenz einzelner, 0,2 – 150 µm großer Zellen gemessen. Kombiniert mit unterschiedlichen Oberflächenmarkern helfen Lichtstreuung und Fluoreszenz bei der Differenzierung verschiedener zellulärer Parameter und der Sortierung von Zellen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Gerät FACSCalibur® der Firma BD Biosciences (Heidelberg) zur quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Zytokinen muriner Zellen verwendet, nicht aber zur Separierung von Zellen. Es kamen zwei Laser zum Einsatz mit denen vier verschiedene Fluoreszenzen erzeugt und gemessen werden konnten.

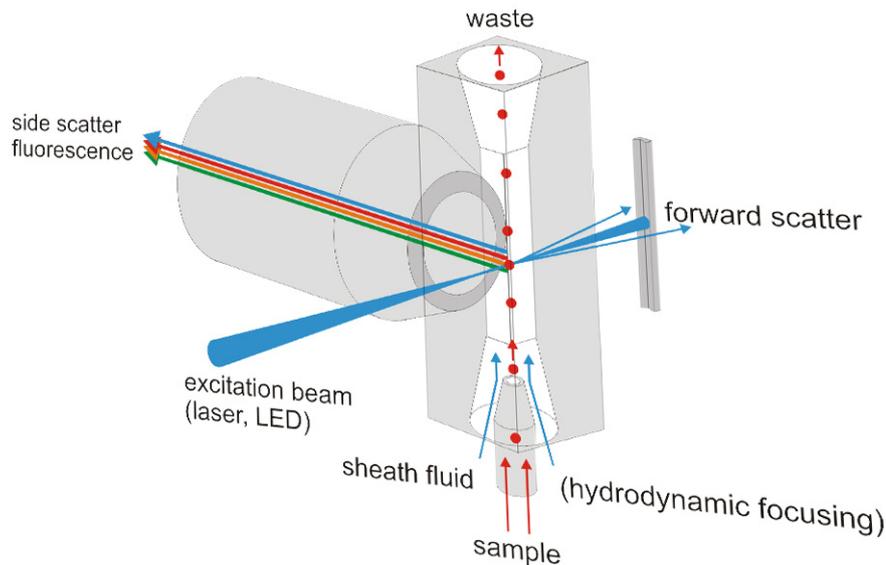
---

##### 4.4.1.1 PRINZIP

---

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen durch Lichtstreuung und Lichtemission analysiert und charakterisiert. Aufgrund der individuellen Zelleigenschaften können Fluoreszenzfarbstoff- markierte Antikörper spezifisch an die Oberflächenmoleküle

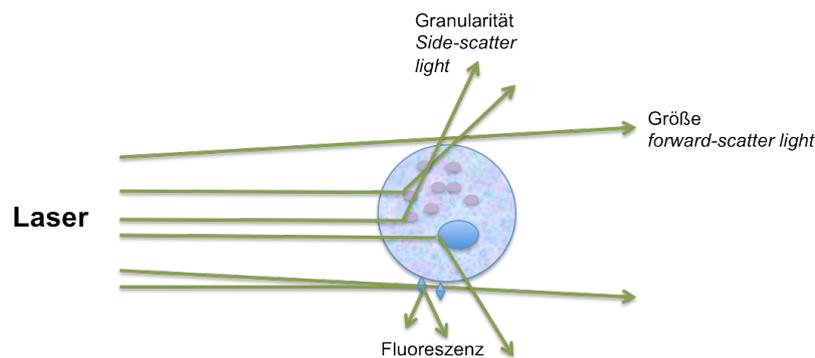
oder intrazellulären Moleküle binden und über Laser, Detektoren und Durchflusszytometer quantitativ erfasst werden. Die zu untersuchende gefärbte Einzelzellsuspension läuft in einem Überdrucksystem zusammen mit einer Trägerflüssigkeit als laminarer Strom durch eine Durchflusszelle (*flow cell*), in der die einzelnen Zellen über hydrodynamische Fokussierung von einem Laserstrahl beleuchtet werden (s. Abb. 4.2).



**Abb. 4.2 Prinzip der Durchflusszytometrie.** Fluoreszenzfarbstoff- markierte Zellen werden bei der durchflusszytometrischen Messung in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt. Hierbei wird das Licht durch die extra- und intrazellulären Strukturen der Zelle gebrochen sowie reflektiert (Seitwärtsstreulicht, SSC) und proportional zu Zellgröße gebeugt (Vorwärtsstreulicht, FSC). Linsen, Spiegel und Filtersysteme leiten SSC, FSC sowie die durch den Laser angeregte Emission der spezifischen Fluoreszenzmoleküle in den Zellen an die entsprechenden Detektoren des elektronischen Systems weiter (adaptiert und modifiziert von Laborwelt, 2012 [422]).

Der auftreffende Laserstrahl wird abhängig von der Größe der Zellen um  $3 - 10^\circ$  gebeugt, was als *forward-scattered light* (FSC) von einer Fotodiode erfasst wird. Das *side-scattered light* (SSC) beschreibt die Seitwärtsstreuung des Lichts, welche durch die Lichtbrechung und Reflektion an den Zellgranularitäten oder anderen intrazellulären komplexen Strukturen hervorgerufen wird. SSC wird in einem  $90^\circ$  Winkel zum Laserstrahl von einer Sammellinse erfasst und an einen SSC-Detektor weitergeleitet. Somit variieren die Lichtstreuungs- und Beugungseigenschaften der einzelnen Zellen in Abhängigkeit ihrer physikalischen Parameter wie in Abb. 4.3 dargestellt. Die an die Zellen gebundenen Fluoreszenz-Farbstoffmoleküle absorbieren das auftreffende Laserlicht und geben diese Energie verzögert in Form

von Photonen wieder ab, welche dann über optische Filter und Detektoren des Durchflusszytometers gemessen werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist hierbei direkt proportional zur Anzahl der durch Antikörper an externen oder internen Zellmolekülen konjugierten Fluorochrome. Bei einer extrazellulären Antikörperfärbung findet eine Erkennung von Epitopen auf der Zelloberfläche statt, wohingegen bei der intrazellulären Färbung nach Permeabilisierung der Zelle spezifischer Bestandteile im Zellinneren detektiert werden.



**Abb. 4.3 Lichtstreuungs- Eigenschaften einer Zelle.** Über Lichtbrechung und –reflektion im Laserstrahl, welche durch die extra- und intrazellulären Strukturen der Zelle entstehen, wird SSC bemessen. FSC gibt die Beugung des Lichtes proportional zur Größe der Zelle an. Die Erfassung und Bemessung der Lichtstreuungs- Eigenschaften der Zelle erfolgt für SSC über einen *Side- Scatter*- Detektor, im 90° Winkel zum Laserstrahl über eine Sammellinse, und für FSC in Richtung des einfallenden Laserstrahls über eine Photodiode.

Die detektierten Lichtsignale werden im elektronischen System verarbeitet und in digitale Signale umgewandelt und schließlich als zweidimensionale Punkt-Diagramme (Dotplots) in Mess- und Auswertefenster dargestellt. Ein Punkt repräsentiert eine Zelle und die Intensität der elektronischen Signale ist proportional zu den aufgefundenen optischen Signalen. In Tab. 4.1 werden die 4 verwendeten Fluoreszenzkanäle (FL), Farbstoffe, Absorptionsmaxima und Emissionsmaxima dargestellt mit denen die Fluoreszenz- Intensität der Fluorochrom- markierten Zellen erfasst wird. Die verschiedenen Farbstoffe unterscheiden sich in den Wellenlängenbereichen ihrer Emissionsmaxima, sodass die Abstrahlung in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FL- 1 bis FL- 4) gemessen werden kann.

Tab. 4.1 Verwendete Fluoreszenzstoffe

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptions- Maximum	Emissions- Maximum
FL- 1	FITC (FLuorescein Isocyanat)	495 nm	519 nm
FL- 2	PE (Phycoerythrin)	488 nm	565 nm
FL- 3	PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	488 nm	695 nm
FL- 4	APC (Allophycocyanin)	650 nm	660 nm

#### 4.4.1.2 FÄRBUNG VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN

Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden für die verschiedenen Färbungskombinationen jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in einer 96 well Rundbodenplatte vorgelegt und mittels Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) die Zellen vom Kulturmedium getrennt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment mit Hilfe eines Schüttlers (30 sec, 500 rpm) gelöst, in 50 µl FC- Block/ well (50 µl Cellwash<sup>®</sup> mit 5 µl einer 1 mg/ml Maus IgG- Lösung) aufgenommen und für 6 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Dieser Block- Schritt wurde durchgeführt um spätere unspezifische Bindungen der Antikörper zu inhibieren. Im Anschluss folgte die Färbung der Oberflächenmoleküle. Hierzu wurden die Antikörper oder Isotyp- Kontrollen (s. Tab. 3.4) in Cellwash<sup>®</sup> austitriert und in einem Volumen von 50 µl zu der Zellsuspension pipettiert. Nach einer weiteren 15 minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen mit 100 µl Cellwash<sup>®</sup> gewaschen und zentrifugiert (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde nach dem Aufschütteln in 200 µl Cellwash<sup>®</sup> aufgenommen und in ein 5 ml Rundbodenröhrchen (FACS- Tube), gefüllt mit 50 µl Cellwash, überführt. Die Messung der Zellen erfolgte mit einem FACSCalibur™ unter Verwendung des Programms *Cell quest Pro* (BD Biosciences) zur Aufzeichnung und Auswertung der Daten.

#### 4.4.1.3 INTRAZELLULÄRE FÄRBUNG

Die Zellen wurden in zwei verschiedenen Versuchsabläufen intrazellulär gefärbt. Entweder wurden die Zellen für 24 Stunden kultiviert und die Zellen aus der Lunge mittels *P. aeruginosa* und die Milzzellen mittels CpG stimuliert oder direkt nach Aufbereitung der Zellen aus Milz und Lunge mit 0,5 µg/ml PMA (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 5 µg/ml Ionomycin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) für eine Stunde

stimuliert. PMA stimuliert T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität und Ionomycin wirkt als  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor, welches der zusätzlichen Aktivierung der T-Zellen dient. Um mittels einer durchflusszytometrischen Messung die intrazelluläre Zytokinproduktion messen zu können, müssen Protein-Transport-Vorgänge zwischen Intra- und Extrazellulärraum blockiert werden. Durch die Blockade sammeln sich die Zytokine der Zelle in den Golgikomplexen ohne abgebaut zu werden. In dieser Arbeit wurde der Protein-Transport-Inhibitor Monensin (GolgiStop™ 0,66 µl/ml, BD Biosciences) verwendet, mit dem die Zellen für sechs Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurden  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen in eine 96 well Rundbodenplatte überführt und die Oberflächenmoleküle nach bereits beschriebenem Protokoll (s. Kapitel 4.4.1.2) gefärbt. Um die Zellen für die zur intrazellulären Färbung verwendeten Antikörper durchlässig zu machen, wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss fixiert und permeabilisiert. Das verwendete Produkt Cytoperm/ Cytifix® (150 µl pro well) von BD Bioscience enthält Paraformaldehyd zur Fixierung und Saponin zur Permealisation der Zellmembran. Im folgenden Schritt wurden die Zellen zentrifugiert (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C), aufgeschüttelt und mit 200 µl pro well saponinhaltigem Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden wiederholt zentrifugiert (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) und 15 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss mit der vorgegebenen Menge an Antikörper für IL-12 oder IFN- $\gamma$ , aufgenommen in 50 µl Permeabilisierungspuffer, inkubiert. Nach Waschen mit Permeabilisierungspuffer und Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C) wurden die Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse in 200 µl Cellwash® aufgenommen, welches auch zur Wiederverschließung der Zellmembran dient.

#### 4.4.1.4 DETEKTION VON *REACTIVE OXYGEN SPECIES* (ROS)

Neutrophile Granulozyten besitzen, neben der Fähigkeit zur Phagozytose, die Möglichkeit reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) zur Abwehr von Pathogen im Organismus zu bilden [423]. Ob ROS gebildet werden, kann mit Hilfe des nicht-fluoreszenten, ungeladenen Indikator Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) überprüft werden. Das DHR 123 wird durch die gebildeten Sauerstoffradikale zu dem grün fluoreszierenden Rhodamin 123 (R 123) oxidiert,

welches über FACS- Analyse bei der Emission von 500 nm und 536 nm oder die Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm ermittelt werden kann.

Zur Zellfärbung mit DHR 123 wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium pro well auf einer 96 well- Mikrotiterplatte mit Flachboden in Triplikaten ausgesät und für eine Stunde in einem Brutschrank bei 5 % igem CO<sub>2</sub>/ Luft- Gemisch, wasserdampf-gesättigter Atmosphäre und 37 °C inkubiert. Vor der nächsten einstündigen Inkubation wurden die Zellen mit 2  $\mu$ l/ well ( $1 \times 10^9$  CFU/ ml) UV- inaktivierten *P. aeruginosa* stimuliert. Hiernach folgte eine Zentrifugation, Resuspension und fünfminütige Inkubation der Zellen mit der austitrierten DHR 123- Lösung im Brutschrank. Unter Hinzugabe von 50  $\mu$ l/ well PBS wurden die Zellen gewaschen, gefolgt von einer Zentrifugation (460 g, 1500 rpm, 6 min, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen aufgeschüttelt und zur FACS- Färbung (siehe 3.4.1.2) gegen das Oberflächenmolekül Ly6G in einer 96 well Rundbodenplatte gepoolt.

---

#### 4.4.2 ENZYME- LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (ELISA)

---

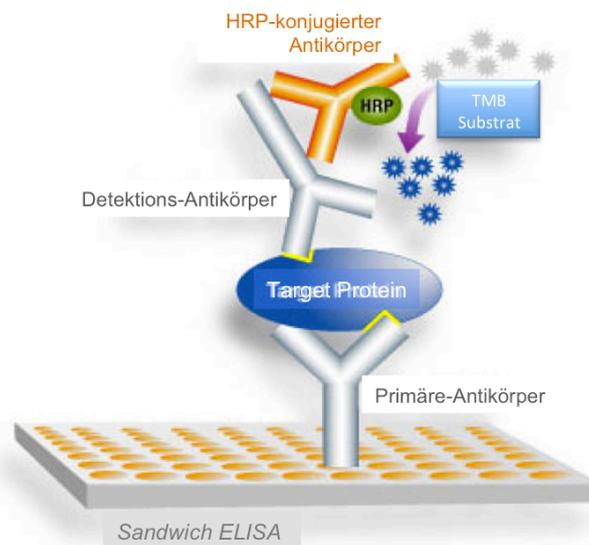
Um die Zytokine aus den Überständen der verschiedenen Zellkulturen zu bestimmen und zu quantifizieren, wurden ELISA- DuoSets (s. Tab. 3.5) nach Herstellerangaben verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Auswertung der ELISA wurde ein Mikroplatten- Absorptionsreader ELx808 der Firma BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall) unter Zuhilfenahme des Programms MikroWin (Version 3.0 und 2000, Mikrotek Laborsysteme GmbH) zur Berechnung der Zytokinmenge verwendet.

##### 4.4.2.1 PRINZIP

---

Die in dieser Arbeit durchgeführten ELISA Tests beruhen auf dem Prinzip der Sandwich- Technik (s. Abb. 4.4). Hierbei wird das zu untersuchende Zytokin durch indirekte Bindung über einen Primärantikörper in der ELISA- Platte fixiert und über einen polyklonalen, Biotin- konjugierten Sekundärantikörper detektiert sowie zu einem Sandwich- Komplex verbunden. An einen weiteren Antikörper konjugiertes

Enzym bindet den Detektionsantikörper und durch enzymatische Substratumsetzung in Farbstoff kann eine Aussage über die Menge an Antigen getroffen werden.



**Abb. 4.4 Schematische Darstellung des Prinzips des Sandwich-ELISA.** Das Zielprotein wird von einem auf der Platte gebundenen Primärantikörper fixiert und von einem Sekundärantikörper detektiert. Durch dessen Bindung kommt es zum Sandwich-Effekt. Durch enzymatische Umsetzung eines Substrates welches über einen weiteren Antikörper gebunden wird, entsteht ein farbiges Produkt. Dieses wird mittels Fotometrie gemessen (CellSignaling Technology, Inc., Danvers, USA, 2012, modifiziert [424]).

#### 4.4.2.2 DURCHFÜHRUNG

Zur Durchführung der ELISA-DuoSets wurde im ersten Schritt ein monoklonaler Primärantikörper verdünnt in PBS in einem Volumen von 100 µl auf einer 96 well Flachboden-Mikrotiterplatte aufgetragen um an dieser unspezifisch zu binden (*Coaten*). Nach der Inkubation über Nacht wurden überschüssige, ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer aus der Platte entfernt und die unbesetzten Adhäsionsflächen des Kunststoffbodens durch Serumproteine der Blocklösung (1 % in D-PBS verdünntes FCS in 250 µl pro well) inhibiert. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation und einem weiteren Waschschrift, wurden die Zellkulturüberstände in der jeweils erforderlichen Verdünnung, sowie der dazugehörige Standard, in einer zweifachen seriellen Verdünnung mit Medium in einem Volumen von 100 µl pro well auf die Platte aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Zur Detektion des Komplexes aus Antigen und Primärantikörper wurden die Überstände mittels dreimaligen Waschens

mit Waschpuffer entfernt und je 100 µl des biotinierten Sekundärantiköpers pro well pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurde nochmals dreimalig mit Waschpuffer gewaschen und die Platte dann für 20 bis 30 Minuten mit einem Konjugat aus Antikörper- Streptavidin- Enzym (Streptavidin- *Horseradish* Peroxidase, HRP) in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Stretavidin- Konjugats fand eine dreimalige Waschung der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer statt. Anschließend wurden 100 µl pro well einer zusammengesetzten Substratlösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) (Substratlösung A + B im Verhältnis 1:1) hinzugefügt und für fünf bis 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um die enzymatische Substratumsetzung durch die HRP zu stoppen, wurde 1 M Schwefelsäure in einer Menge von 50 µl den einzelnen wells hinzugefügt und direkt die Absorption des entstandenen Farbstoffs gemessen.

## 4.5 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

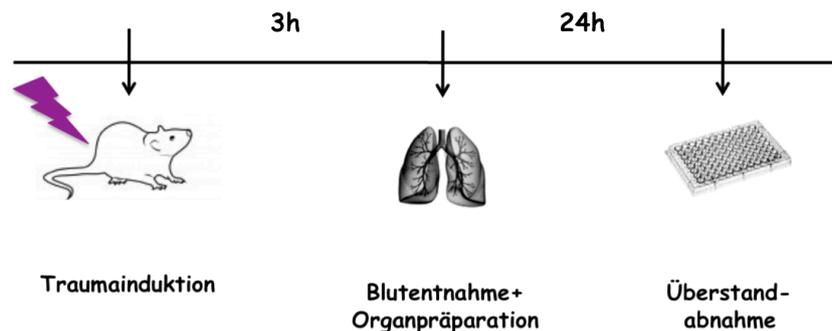
---

### 4.5.1 CHARAKTERISIERUNG DER IMMUNOLOGISCHEN ZELLZUSAMMENSETZUG DER LUNGE NACH TRAUMA

---

An Tag Null wurden die naiven Versuchstiere narkotisiert und den Mäusen der Traumagruppe ein geschlossenes Weichteiltrauma auf den *M. gastrocnemius* beider Hinterbeine appliziert (s. Kapitel4.1). Die Mäuse ohne Muskeltrauma dienten der Narkosekontrolle. Zur Untersuchung der Auswirkung einer Immunmodulation in Organen außerhalb des Bereichs des Muskeltraumas, hier speziell in der Lunge, wurde Blut entnommen und die Lunge zu den Zeitpunkten eine Stunde, drei Stunden, sechs Stunden, 24 Stunden, vier Tagen und sieben Tage nach Traumaapplikation präpariert und die Veränderungen in einer Zeitkinetik dargestellt. In einzelnen Experimenten wurde in Zuge dessen auch andere Organe wie Milz, Knochenmark, Muskeln und Lymphknoten entnommen. Die Organzellen wurden isoliert und mittels Extra- sowie zum Teil Intrazellulärfärbung durchflusszytometrisch analysiert (s. Kapitel4.4.1). Zur Untersuchung des Zytokinmusters nach Weichteiltrauma wurden Zellkulturen mit und ohne Stimulation angelegt und nach 18 bis 22 Stunden die Zytokine in den Überständen mittels ELISA, wie in Kapitel4.4.2 erläutert, bestimmt. Ein Teil des gewonnen Vollbluts wurde naiv zur FACS- Analyse

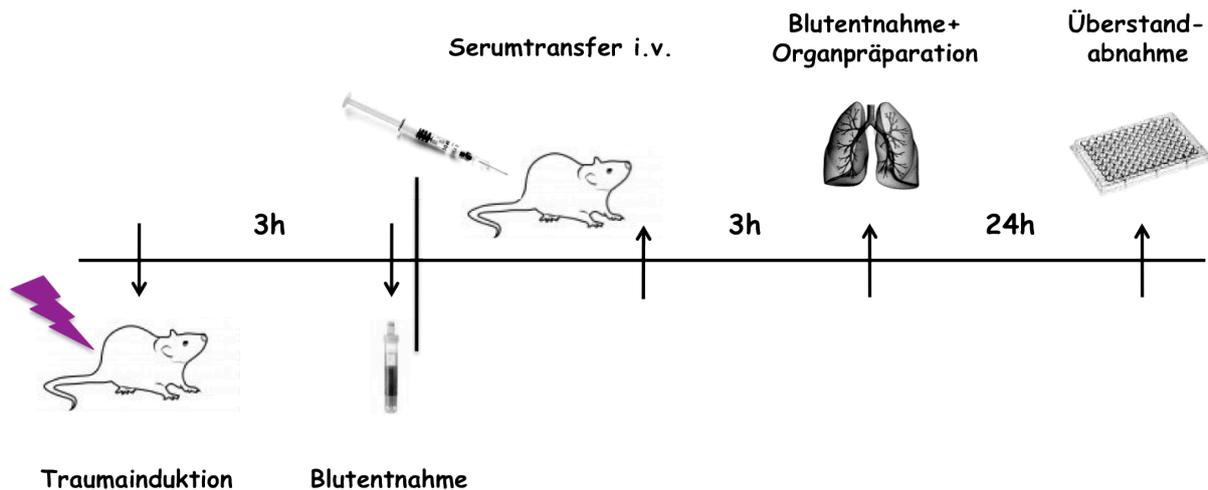
verwendet. Aus dem anderen Anteil des Blutes wurde Serum gewonnen, welches partiell zur Analyse der S100A8/ S100A9- Protein-Konzentration diente, welche in freundlicher Kooperation von PD Dr. VOGL im Institut für Immunologie der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster durchgeführt wurde. Der Versuchsablauf ist in Abb. 4.5 skizziert.



**Abb. 4.5 Beispielhafte Darstellung des Versuchsablaufs eines drei- Stunden- Traumas.** Traumainduktion auf die Wadenmuskulatur oder Einleitung der Narkosekontrolle zum Zeitpunkt 0, Organentnahme und FACS- Analyse nach drei Stunden (versuchabhängig auch zu den Zeitpunkten 1h, 6h, 24h, 4d oder sieben Tage). Kultivierung der gewonnen Zellen für 24 Stunden.

#### 4.5.2 EINFLUSS LÖSLICHER KOMPONENTEN AUF GRANULOZYTENREKRUTIERUNG IN DIE LUNGE NACH WEICHTEILTRAUMA

Zur Klärung der Frage ob lösliche Komponenten bei der Granulozytenrekrutierung in die Lunge nach Weichteiltrauma mitverantwortlich sind, fand ein Transfer von Serum traumatisierter und nicht- traumatisierter Mäuse in naive Tiere statt (s. Abb. 4.6). Dazu wurde den Spendermäuse drei Stunden nach Traumainduktion, als Zeitpunkt der höchsten Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Muskeltrauma in der Zeitkinetik, Vollblut abgenommen und Serum gewonnen. Das Serum wurde in einem Volumen von 100 µl von je einer Maus der Trauma- oder Narkosekontrollgruppe in die Schwanzvene eines naiven Tieres injiziert.



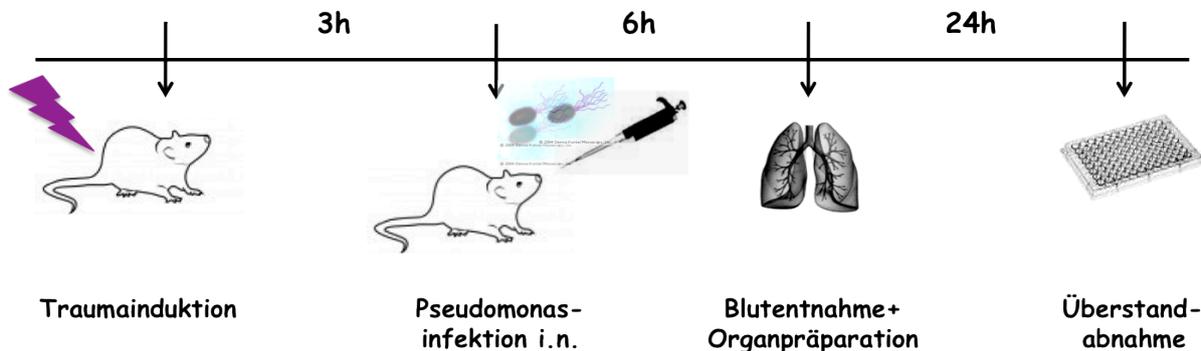
**Abb. 4.6 Versuchsablauf mit Serumtransfer.** Versuchstieren einer Trauma- sowie deren Kontrollgruppe wurde 3 Stunden nach Trauma-induktion zur Gewinnung von Serum Blut abgenommen. Dieses Serum wurde von je einer traumatisierten oder Kontrollmaus in je eine naive Maus per i.v.- Injektion in die Schwanzvene appliziert. Drei Stunden nach Serumtransfer auf die naiven Tiere wurden die Organe entnommen und durchflusszytometrisch analysiert oder die isolierten Zellen für 24 Stunden kultiviert.

Nach einer Inkubationsperiode von drei Stunden nach Serum- Applikation wurde den Mäusen des Serumtransfers Blut entnommen und die Lungen präpariert. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Bestimmung der Zytokinexpression in einer Zellkultur angelegt. Auch das gewonnene Vollblut wurde mittels FACS nach Färbung der Oberflächenmoleküle untersucht.

#### 4.5.3 AUSWIRKUNG EINER BAKTERIELLEN INFEKTION NACH TRAUMA AUF DIE GRANULOZYTENINFILTRATION IN DIE LUNGE

Zu den Zeitpunkten drei Stunden und vier Tage nach Trauma, wurden die Tiere mit und ohne Trauma- Induktion mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien infiziert um die Auswirkung einer bakteriellen Infektion nach einem extrapulmonalen Trauma auf die Lunge zu untersuchen. In Abb. 4.7 wird der Versuchsablauf bildlich dargestellt. Insgesamt wurden vier Versuchsgruppen von je zwei Narkosekontrollgruppen und je zwei Traumakontrollgruppen zusammengestellt. Hiervon wurden Mäuse je einer Narkosekontrollgruppe und einer Traumakontrolle mit  $5 \times 10^8$  CFU *P. aeruginosa* i.n. infiziert oder mit PBS als Negativkontrolle behandelt.

Zur i.n. Applikation wurde ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$ / Nasenloch/ Tier ( $\Sigma$  20  $\mu\text{l}$  pro Tier) verabreicht. Nach sechs Stunden wurden die Organe entnommen.



**Abb. 4.7 Versuchsablauf im Infektionsmodell.** Insgesamt zwei von vier Mausversuchsgruppen wurde ein Muskeltrauma auf die Wadenmuskulatur appliziert. Die beiden anderen Versuchsgruppen dienen der Narkosekontrolle. Nach drei Stunden erfolgte für je eine Trauma- und eine Narkosekontrollgruppe die bakterielle Infektion mittels i.n.-Instillation UV-inaktivierter Pseudomonaden. Sechs Stunden nach Infektion wurden die Organe aller Tiere entnommen und die Zellen isoliert. Ein Teil der Zellen wurde für weitere Zytokinanalysen 24 Stunden kultiviert.

#### 4.6 STATISTISCHE ANALYSEN

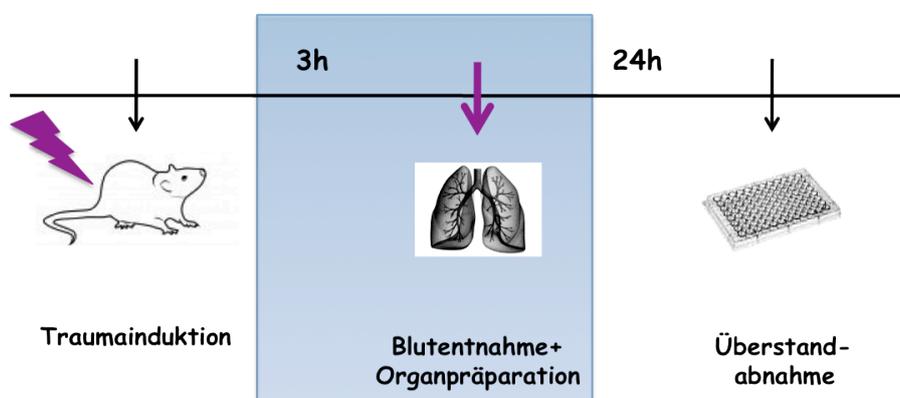
Die erhobenen Daten wurden statistisch und graphisch mit der Software GraphPad Prism 4.0 analysiert. Die Ergebnisse von vorher definierten Messreihen sind in der Regel als Median und der Spannweite (range) dargestellt. Bei der Analyse einzelner Experimente mit mindestens  $n=3$  Mäusen werden die Daten als absolute Zahl der Zellen pro Lunge dargestellt, ermittelt aus den durchflusszytometrisch gemessenen prozentualen Angaben und aus der Gesamtzahl der isolierten Lungenzellen (s. Kapitel 4.3.4). Die Daten über den Vergleich mehrerer Versuchseinheiten mit  $n=2$  bis 6, jeweils zum selben Zeitpunkt, wurden für jedes Experiment auf den Median der Kontrollgruppe normalisiert und dann statistisch ausgewertet. Zur Veranschaulichung der einzelnen Werte wurden die Daten als Punktwolken dargestellt. Zum Vergleich von zwei Versuchsgruppen (Trauma und Kontrolle) wurde ein ungepaarter, nicht-parametrischer „*Mann-Whitney U*“-Test angewendet. Waren mehr als zwei Gruppen zu vergleichen, wurde die Analyse mit einem ungepaarten, nicht-parametrischen „*Kruskal-Wallis*“-Test mit folgendem „*Dunn's Multiple Comparison*“-Test durchgeführt. Die Ergebnisse der Zytokinanalyse, wurden mit einem „*one-way ANOVA*“-Test und nachfolgendem

„*Newman-Keuls*“- Test verglichen und graphisch dargestellt als die Mittelwerte mit der Standardabweichung. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde allgemein als statistisch signifikant erachtet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 CHARAKTERISIERUNG DER ZELLULÄREN IMMUNMODULATION NACH TRAUMA

Männlichen BALB/c- Mäusen wurde ein geschlossenes Weichteiltrauma auf die *Gastrocnemius*- Muskulatur wie in Kapitel 4.1 beschrieben appliziert. In einer Zeitkinetik wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut und die Lungen entnommen und mittels FACS- Analyse untersucht (s. Abb. 5.1).

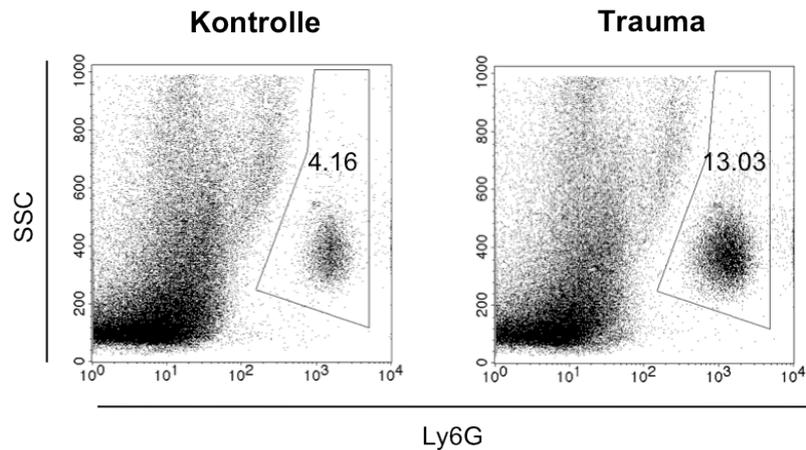


**Abb. 5.1 (modifizierte Abb. 4.5) Versuchsaufbau Induktion eines Weichteiltraumas.** Hervorgehoben wird die Organpräparation und Zellisolation sowie Blutentnahme aus Versuchstieren drei Stunden nach Trauma oder Narkosekontrolle zur Analyse von Immunzellen aus Lunge, Blut und anderen Organen. Zur Erstellung einer Zeitkinetik variierte der Zeitpunkt der Organ- bzw. Blutentnahme nach Trauma zwischen einer Stunden und sieben Tagen.

#### 5.1.1 MODULATION DER GRANULOZYTENANZAHL NACH WEICHTEILTRAUMA

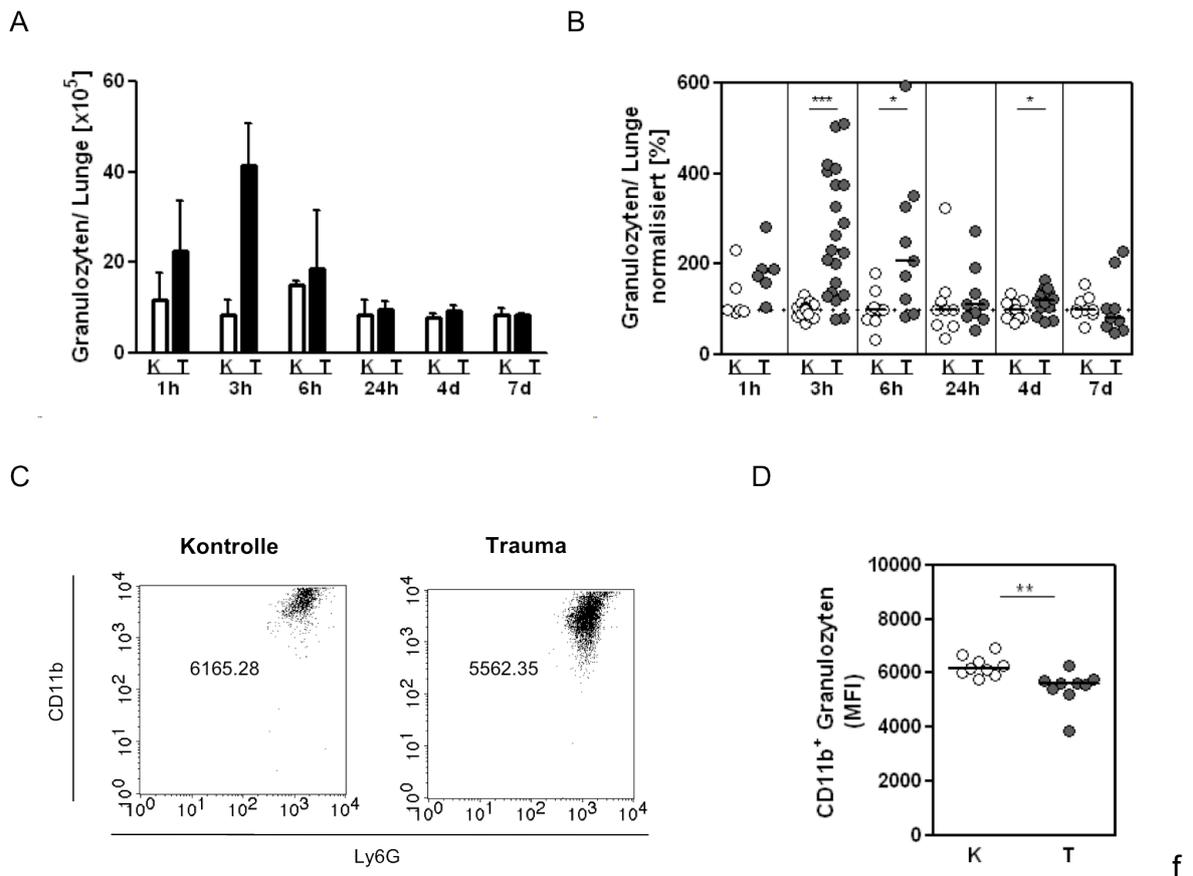
##### 5.1.1.1 GRANULOZYTEN IN DER LUNGE

Nach durchflusszytometrischer Analyse der Lungenzellen konnte eine erhöhte Anzahl von Ly6G<sup>+</sup> 11c<sup>-</sup> Granulozyten nach Weichteiltrauma (s. Abb. 5.2) in der Lunge nachgewiesen werden.



**Abb. 5.2 Durchflusszytometrische Messung von Granulozyten in der Lunge.** Darstellung des Granulozyten- Einstroms in die Lunge mittels Dotplots jeweils bei einem Tier mit und einem ohne Trauma- Induktion drei Stunden nach Trauma. In der Gating- Strategie zur Bestimmung des Anteils an Granulozyten (Ly6G<sup>+</sup>) zeigt sich, dass sich in der Lunge des traumatisierten Tieres deutlich mehr (12.88 %) Granulozyten befinden als in der Lunge eines Tieres der Narkosekontrollgruppe (4.89 %).

Mäuse nach Skelettmuskel- Traumatisierung zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren drei Stunden, sechs Stunden und nochmals vier Tage nach Trauma signifikant erhöhte Granulozytenanzahl in den Lungen. 24 Stunden nach Trauma- Induktion war die pulmonale Infiltration an Granulozyten rückläufig und zum Zeitpunkt sieben Tage nach Trauma im Bereich der Normwerte von Kontrolltieren. In der Zeitkinetik, wie in den Abb. 5.3 A + B zusammengefasst, konnte schon eine Stunde nach Trauma eine Tendenz zur Erhöhung der Granulozytenzahl in den Lungen von Traumatieren festgestellt werden. Das Maximum der Granulozyteninfiltration wurde in diesen vorgenommenen Messeinheiten drei Stunden nach stumpfer Muskelverletzung der Wadenmuskulatur ermittelt, wobei der normallisierte Wert für den Median der Kontrollgruppe von 100% in der Traumagruppe auf 232,16% anstieg. Die Expression des Aktivierungsmaker CD11b war an der Oberfläche der gemessenen Granulozyten in der Lunge zu dem Zeitpunkt der maximalen Infiltration an Granulozyten, drei Stunden nach Trauma, in der signifikant erniedrigt im Vergleich zu der Narkosekontrolle. In der Dotplot- Darstellung in Abb. 5.3 C wird die deutlich niedrigere Granulozytenanzahl der Kontrollgruppe verglichen mit der Gruppe der Tieren nach Traumainduktion sichtbar, währenddessen diese aber einen erhöhten MFI (*mean fluorescence intensity*) an CD11b aufweisen (ausgewertet in Abb. 5.3 D). Der Median des MFI der CD11b<sup>+</sup> Granulozyten der Narkosekontrolle betrug 6250.02 und in der Traumagruppe reduziert auf 5634.69.

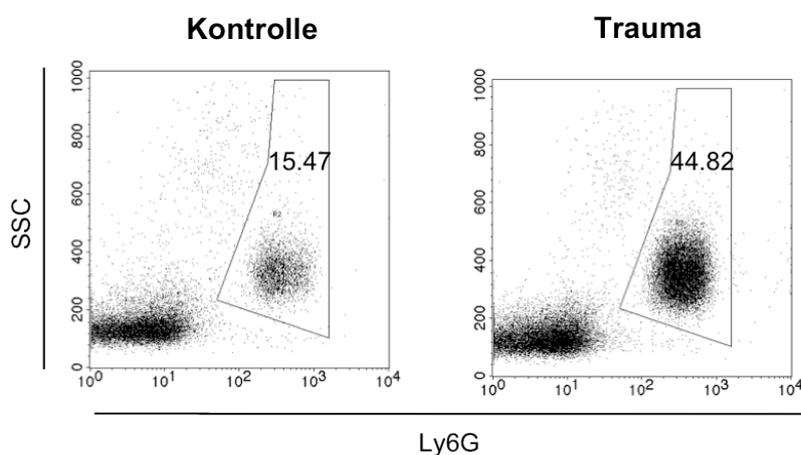


**Abb. 5.3 Zeitkinetik zur Granulozytenanzahl in der Lunge und CD11b- Expression der Granulozyten.** Die Lungen der Versuchstiere wurden zu den Zeitpunkten 1h, 3h, 6h, 24h, 4d und 7d nach Traumatisierung oder Narkosekontrolle entnommen, die Zellen isoliert und mittels FACS- Analyse bestimmt. **A** Dargestellt werden beispielhafte Einzelexperimente mit Median und Spannweite pro Zeitpunkt der Versuchsdurchführung. Im Vergleich dargestellt sind  $n=3$  Versuchstier pro Traumagruppe (T) in einem schwarzen Balken und Kontrollgruppe (K) in einem offenen Balken. **B** Die aus den einzelnen Experimenten ermittelten Daten wurden für jeden Zeitpunkt und jede Versuchsgruppe (T= graue Kreise, K= offene Kreise) gepoolt und jeder Wert auf den Median der Kontrollgruppe für jedes Experiment normalisiert. Der Median ist mittels einer Linie pro Versuchsgruppe markiert. **C** Gemessene CD11b- Expression an der Granulozytenoberfläche mittels FACS, dargestellt als Dotplots. **D** Die Messung der CD11b- Expression an der Oberfläche der Granulozyten in der Lunge zum Zeitpunkt drei Stunden nach Traumainduktion zeigte eine signifikant erniedrigten medianen MFI der CD11b<sup>+</sup>Granulozyten der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen T und K pro Zeitpunkt für die Daten der Abbildungen A + B + D wurde mit Hilfe des nicht- parametrischen „*Man- Whitney U*“- Test ermittelt.  $P < 0,05$  \* bis  $P < 0,001$  \*\*\* wurden als signifikant erachtet.

In dieser Färbung der Oberflächenmoleküle kann keine Differenzierung der PMNs in ihre Unterpopulationen wie eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten vorgenommen werden. Ly6G<sup>+</sup> kennzeichnet neutrophile Granulozyten.

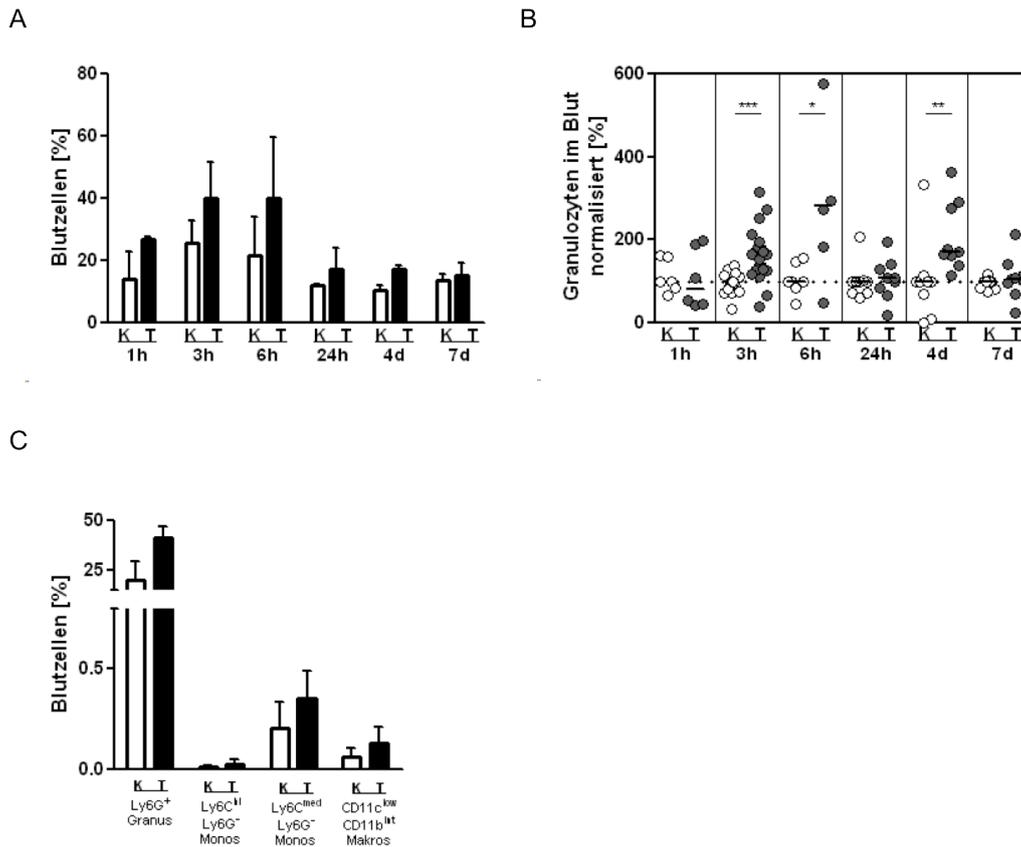
## 5.1.1.2 GRANULOZYTEN AUSSERHALB DER LUNGE

Die Anzahl an Granulozyten im Blut von Versuchstieren mit und ohne Traumatisierung der *Gastrocnemius*-Muskulatur wurde mittels Durchflusszytometrie prozentual (s. Abb. 5.4) analysiert. Die Gesamtzellzahl im Blut wurde nicht ermittelt. Die Blutprobenentnahme der Versuchstiere erfolgte zu den Zeitpunkten der Pulmoektomie (eine Stunde bis sieben Tage nach Trauma). Die Messung der Blutzellen zeigte analog der Ergebnisse zur Granulozyteninfiltration in die Lunge in Kapitel 5.1.1.1 eine signifikante Steigerung der Granulozytenanzahl im Vergleich zu der traumatisierten Versuchstiere mit deren Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten drei Stunden, sechs Stunden und vier Tagen nach Trauma. 24 Stunden und sieben Tage nach Trauma induktion können keine Unterschiede zwischen der Gruppe von Versuchstieren nach Trauma oder Narkosekontrolle erfasst werden. Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma mit der höchsten Signifikanz in der Granulozytenrekrutierung ins Blut war normalisierte Wert für den Median der Kontrollgruppe von 100% in der Traumagruppe auf 176,94% angestiegen.



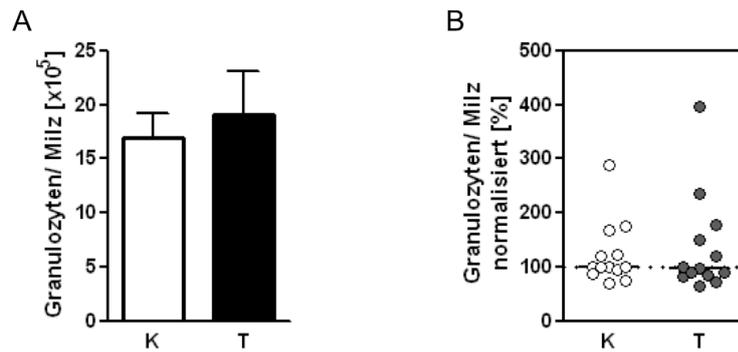
**Abb. 5.4 Durchflusszytometrische Darstellung der gemessenen Granulozyten im Blut.** Der prozentual erfasste Anteil an Ly6G<sup>+</sup> Granulozyten mit Hilfe eines Durchflusszytometers im Blut zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma-Induktion, liegt mit 44.82% des Traumatieres über der Granulozytenzahl eines Tieres nach Narkosekontrolle mit 15.47%.

Die prozentuale Veränderung der Granulozyten im Blut nach Muskeltrauma zu den unterschiedlichen Zeitpunkten kann der Zeitkinetik unter Abb. 5.5 A + B entnommen werden. In der Abb. 5.5 C wird die Zellzusammensetzung der Oberflächenmolekülfärbung nach Ly6C, Ly6G, 11b, 11c dargestellt.



**Abb. 5.5 Prozentualer Anteil an Granulozyten im Blut nach Trauma.** **A** Beispielhafte Darstellung von Granulozytenzahlen in Prozent im Blut einzelner Experimente analog zur Zeitkinetik der Lunge (s. **Abb. 5.3 A + B**). **B** Die Daten der Einzelexperimente sind für jeden Versuch auf den Median der Kontrollgruppe normalisiert für jedes Experiment und in einer Punkt-Wolkendarstellung (T= graue Kreise, K= offene Kreise) abgebildet. Der Median ist mittels einer Linie pro Versuchsgruppe markiert. **C** Zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma sind die Zellen in der Abbildung mit der Gating- Strategie Granulozyten Ly6G<sup>+</sup>, AM CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>intermediär</sup> und Monozyten unterteilt in Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> und Ly6C<sup>med</sup> Ly6G<sup>-</sup> im Vergleich Traumatiere (schwarzer Balken) zur Kontrollgruppe (offener Balken) gezeigt. Der Unterschied zwischen T und K pro Zeitpunkt wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen „*Man-Whitney U*“- Test ermittelt.  $P < 0,05$  \* bis  $p < 0,001$  \*\*\* wurden als signifikant erachtet.

In diesem Traumamodell konnten nach Analyse der isolierten Milzzellen mittels FACS nach Färbung der Oberflächenmoleküle, keine signifikante Infiltration von Granulozyten in die Milz zu den Zeitpunkten drei Stunden (s. **Abb. 5.6 A + B**) und vier Tagen (Daten nicht gezeigt) nach Trauma- Induktion nachgewiesen werden.



**Abb. 5.6 Durchflusszytometrische Analyse von Granulozyten in der Milz.** Neben der Analyse von Lunge und Blut, wurden in drei Experimenten die Zellen der Milz zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach Induktion eines Weichteiltraumas analysiert. **A** Einzelbeispiel zur Darstellung von Granulozytenzahlen von  $n=3$  Tieren pro Versuchsgruppe in der Milz drei Stunden nach Trauma (T= schwarzer Balken, K= offener Balken). **B** Gepoolte Granulozyten- Daten der Einzelexperimente zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma normalisiert auf den Median der Kontrollgruppe für jedes Experiment. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des nicht- parametrischen „*Man-Whitney U*“- Test durchgeführt.

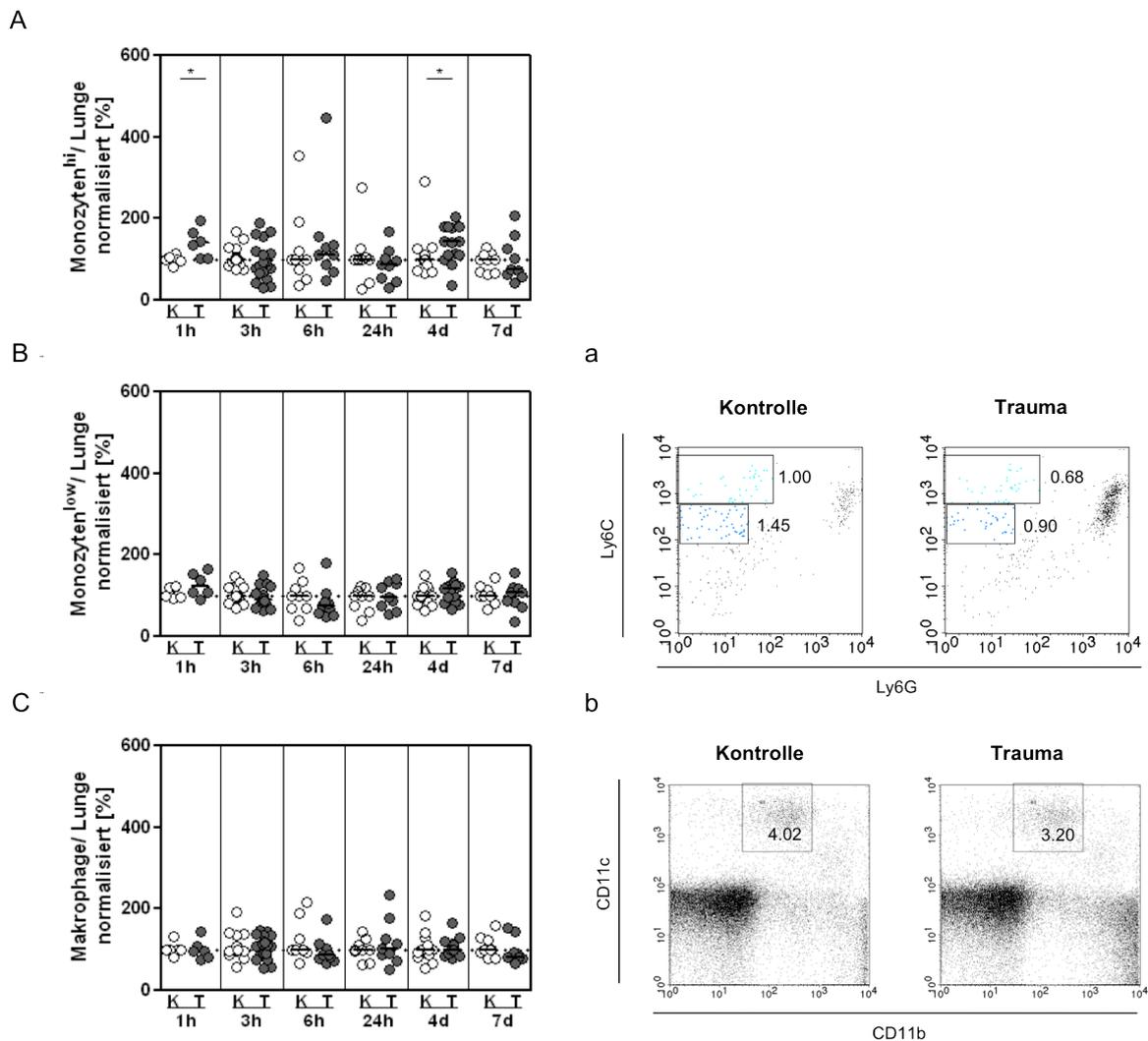
Die Granulozyteninfiltration in die *Gastrocnemius*- Muskulatur beider Hinterbeine nach Trauma war aufgrund der sehr geringen Zellzahl ( $< 0.8\%$ ) zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma schwer nachweisbar, aber es lies sich tendenziell ein Anstieg der Granulozytenzahl (keine Abbildung gezeigt) nach Traumatisierung erkennen. In den poplitealen, inguinalen und cervicalen Lymphknoten lag die Zahl der Granulozyten drei Stunden nach Trauma unter der Nachweisgrenze (keine Abbildung gezeigt).

## 5.1.2 WEITERE IMMUNZELLEN IN DER LUNGE NACH TRAUMA

### 5.1.2.1 MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN

In diesem Versuchsaufbau konnten für die Zeitpunkte eine Stunde bis sieben Tage nach Traumainduktion keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen für die Anzahl an  $\text{Ly6C}^{\text{low}} \text{Ly6G}^-$  Monozyten und  $\text{CD11c}^{\text{low}} \text{CD11b}^{\text{intermediär}}$ - AM in der Lunge festgestellt werden (s. Abb. 5.7 B + C). Jedoch zu den Zeitpunkten eine Stunde und vier Tage nach Trauma- Einwirkung wurde ein signifikanter Anstieg an  $\text{Ly6C}^{\text{hi}} \text{Ly6G}^-$  Monozyten in den Lungen der Mäuse aus der Traumagruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren durchflusszytometrisch gemessen (s. Abb. 4.7 A). In der Dotplot-Darstellung Abb. 5.7 a werden die Messfenster zur Messungen von beiden

Subpopulationen an Monozyten und unter Abb. 5.7 b Makrophagen bildlich dargestellt.

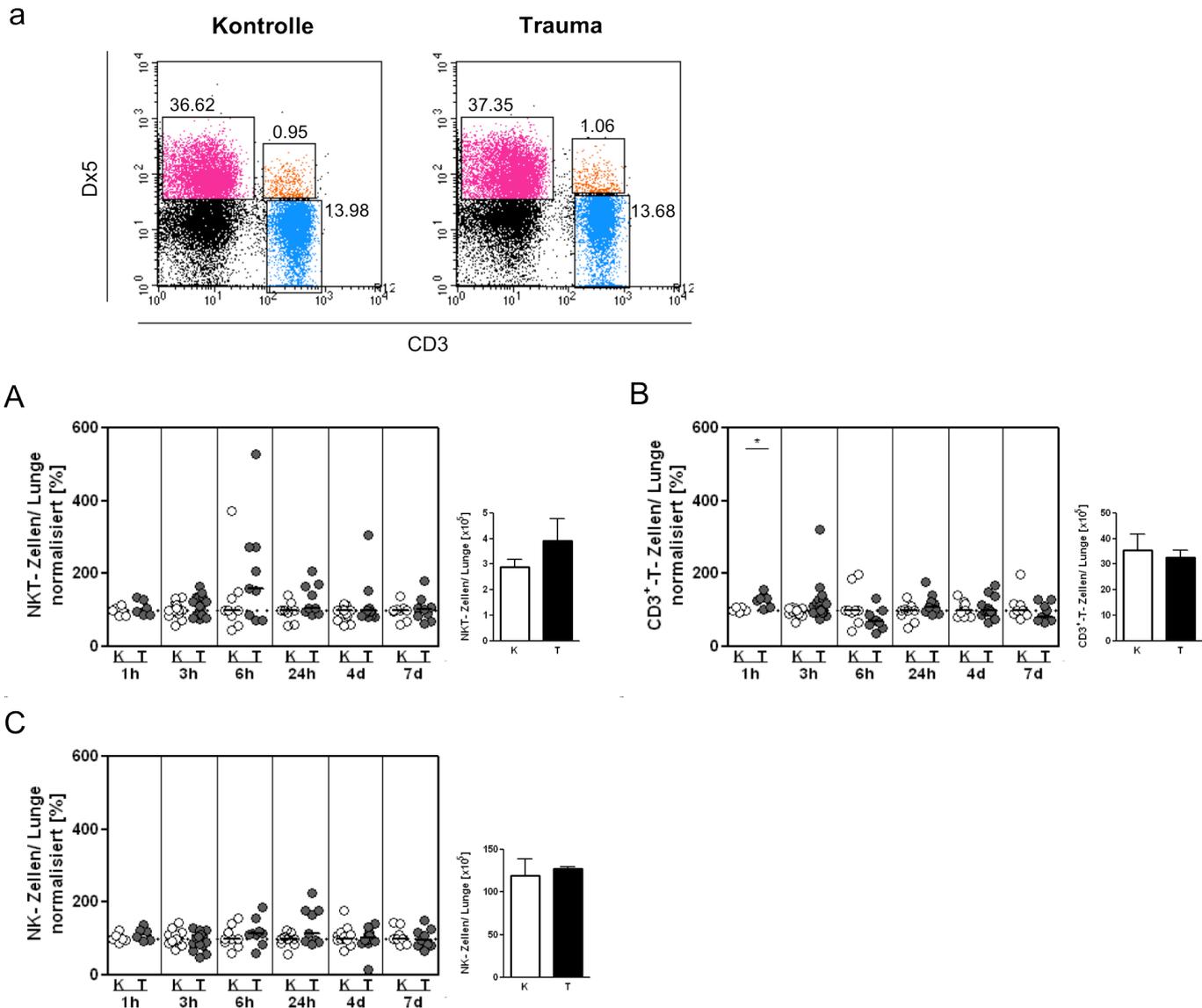


**Abb. 5.7 Monozyten und Makrophagen in der Lunge nach Trauma.** Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma wurden **a** die Monozyten in ihren Subpopulationen Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> (türkise Punkte) und Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> (blaue Punkte) und **b** Makrophagen als CD11c<sup>low</sup> CD11b<sup>intermediär</sup> durchflusszytometrisch in der Lunge erfasst. **A - C** Die aus den einzelnen Experimenten ermittelten Daten der Monozyten<sup>hi</sup>, Monozyten<sup>low</sup> und Makrophagen wurden für jeden Zeitpunkt und jede Versuchsgruppe (T= graue Kreise, K= offene Kreise) gepoolt und jeder Wert auf den Median der Kontrollgruppe für jedes Experiment normalisiert. Der Median ist mittels einer Linie pro Versuchsgruppe markiert. Der Unterschied zwischen T und K pro Zeitpunkt wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen „*Man-Whitney U*“- Test ermittelt. P < 0,05 \* wurde als signifikant erachtet.

### 5.1.2.2 NKT-, CD3<sup>+</sup>- UND NK- ZELLEN

---

Zur Untersuchung ob es durch ein Weichteiltrauma auf die Wadenmuskulatur von Mäusen zu einer Veränderung der Zellzusammensetzung in Hinblick auf NK-, NKT- und CD3<sup>+</sup>- T- Zellen kommt, wurden die isolierten Zellen mit einer Antikörperkombination gegen CD3, CD11b und DX5 gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen (s. Abb. 5.8 a). Es konnte keine gesteigerte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf NK-, NKT- und CD3<sup>+</sup>- T- Zellen von Mäusen der Trauma- oder Kontrollgruppe erfasst werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 5.8 Beobachtung von NKT-, CD3<sup>+</sup>-T- und NK-Zellen nach Trauma in der Lunge.** **a** FACS-Messung mit der Gating-Strategie CD3<sup>+</sup>Dx5<sup>+</sup>- NKT-Zellen (orangene Punkte), CD3<sup>+</sup>Dx5<sup>-</sup>-T-Zellen (blaue Punkte) und CD3<sup>-</sup>Dx5<sup>+</sup>- NK-Zellen (pinke Punkte). Darstellung der NKT- (**A**), T- (**B**) und NK-Zellen (**C**) in einer auf den Median von K für jedes Experiment normalisierten Zeitkinetik (T= graue Kreise, K= offene Kreise) mit jeweils einem Einzelbeispiel (T= schwarzer Balken, K= offener Balken) drei Stunden nach Traumainduktion. Der Median ist mittels einer Linie pro Versuchsgruppe markiert. Der Unterschied zwischen T und K pro Zeitpunkt oder Einzelexperiment wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen „*Man-Whitney U*“-Test ermittelt.  $P < 0,05$  \* wurde als signifikant erachtet.

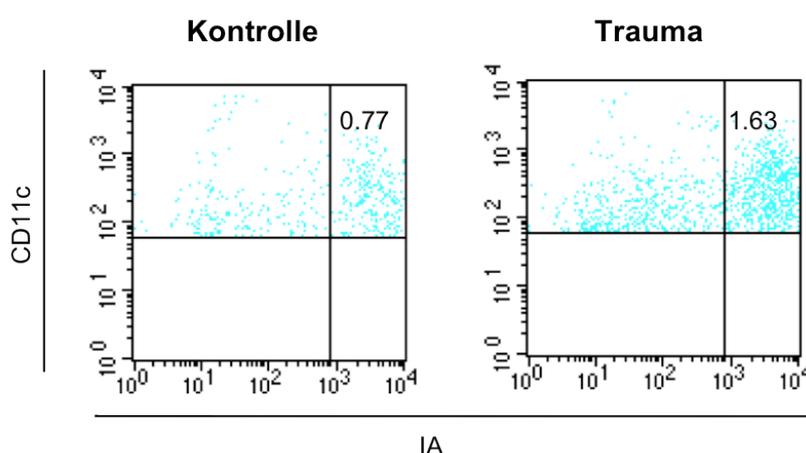
Die Zellanalyse der CD3<sup>+</sup> Dx5<sup>-</sup>- NKT-Zellen und den CD3<sup>-</sup> Dx5<sup>+</sup>- NK-Zellen in der Lunge nach Trauma zu den Zeitpunkten eine Stunde bis sieben Tage nach Traumainduktion ergab keinen Unterschied zwischen den Versuchstieren nach Traumatisierung der Wadenmuskulatur zu der Kontrollgruppe (s. Abb. 5.8 A + C). Es

konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der  $CD3^+ Dx5^-$  T-Zellzahl der Traumatiere eine Stunde nach Trauma im Vergleich zu der Kontrollgruppe verzeichnet werden (s. Abb. 5.8 B). Zu den nachfolgenden Zeitpunkten unterschieden sich die durchflusszytometrischen Messwerte an T-Zellen von Tieren der Traumagruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe nicht mehr. Die gemessenen NK-Zellen in der Milz drei Stunden und vier Tage nach Trauma sowie in den Lymphknoten drei Stunden nach Trauma ergaben keine aussagekräftigen, reproduzierbaren Abweichungen zwischen den Daten der Trauma- und Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt).

Eine Behandlung der Versuchstiere mit Antiasialo zur Depletion der NK-Zellen in einmaliger Durchführung führte zu keiner veränderten Granulozyteneinwanderung in die Lunge drei Stunden nach Trauma im Vergleich zu den Tieren ohne Antiasialo-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

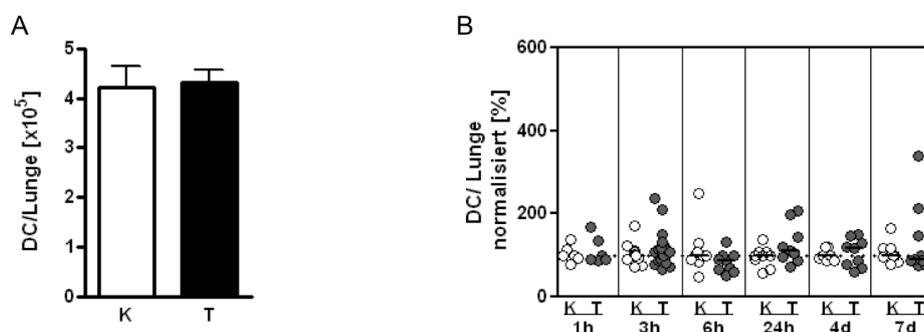
### 5.1.2.3 DENDRITISCHE ZELLEN

Die in Kapitel 4.3.4 gewonnenen Lungenzellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c (als Marker für Konventionelle DC) und IA (MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen) gefärbt und über eine FACS-Messung analysiert (s. Abb. 5.9).



**Abb. 5.9 Durchflusszytometrische Messung von  $CD11c^+$  MHC Klasse II<sup>+</sup>-DCs in der Lunge.** Dotplot-Darstellung der IA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs in der Lunge drei Stunden nach Trauma-Induktion. In der linken Darstellung in der Lunge einer Kontrollmaus sind 0.77% IA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs zu verzeichnen im Vergleich zu 1.63% IA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs in der Lunge einer Maus der Traumagruppe (rechte Darstellung).

Die Auswertung der Daten an CD11c<sup>+</sup> MHC Klasse II<sup>+</sup>- DCs von Traumatieren im Vergleich zu Tieren der Narkosekontrolle zeigte keinen Unterschied im Anteil von CD11c<sup>+</sup>- DCs und Expression an MHC Klasse II- Molekülen zu den Versuchszeitpunkten 1h, 3h, 6h, 24h, 4d und 7d nach Trauma (s. Abb. 5.10 A + B).



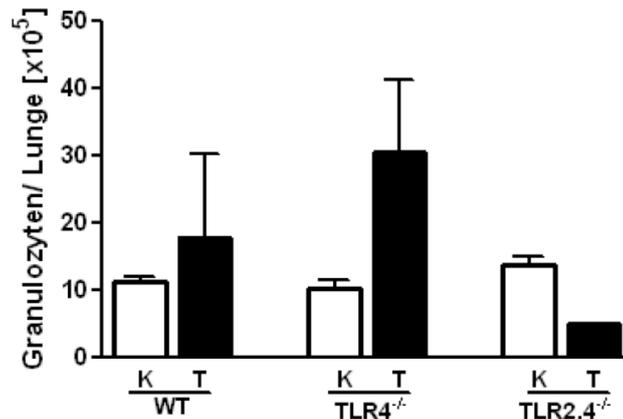
**Abb. 5.10 Unveränderte Anzahl an DCs in der Lunge nach Trauma.** **A** Einzelbeispiel zur Darstellung der absoluten Anzahl der CD11c<sup>+</sup> MHC Klasse II<sup>+</sup>- DCs von n= 3 Versuchstieren pro Vergleichsgruppe drei Stunden nach Trauma (T= schwarzer Balken, K= offener Balken). **B** Gepoolte Daten der Einzelerperimente normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment in einer Zeitkinetik (T= graue Kreise, K= offene Kreise). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des nicht- parametrischen „Man- Whitney U“- Test durchgeführt.

### 5.1.3 MODULATION DER GRANULOZYTENZAHL NACH TRAUMA IN TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2,4<sup>-/-</sup> UND MYD88<sup>-/-</sup>- MÄUSEN

#### 5.1.3.1 TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2,4<sup>-/-</sup>

Zur Fragestellung ob TLR2 sowie TLR4 an der Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Weichteiltrauma beteiligt sind, wurden TLR4<sup>-/-</sup>, TLR-2,4<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen ein Trauma auf die Wadenmuskulatur appliziert. Es wurden das Blut sowie die Lungen durchflusszytometrisch untersucht. Nicht-traumatisierte Mäuse dienten als Narkosekontrolle. Die Abb. 5.11 zeigt die unterschiedliche Granulozytenanzahl in der Lunge mit und ohne Traumainduktion in Wildtyp- BALB/c- Mäusen und in Abhängigkeit der unterschiedlichen „knock out“- Faktoren TLR4<sup>-/-</sup>, TLR-2,4<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup>. Die TLR-4<sup>-/-</sup>-Versuchstiere der Traumagruppe (n= 3) zeigten drei Stunden nach Trauma eine erkennbar erhöhte aber statistisch nicht signifikante Infiltration von Granulozyten in die Lunge. Bei den TLR2,4<sup>-/-</sup>- Traumatieren (n= 3) hingegen, kam es zu einer geringeren Infiltration von

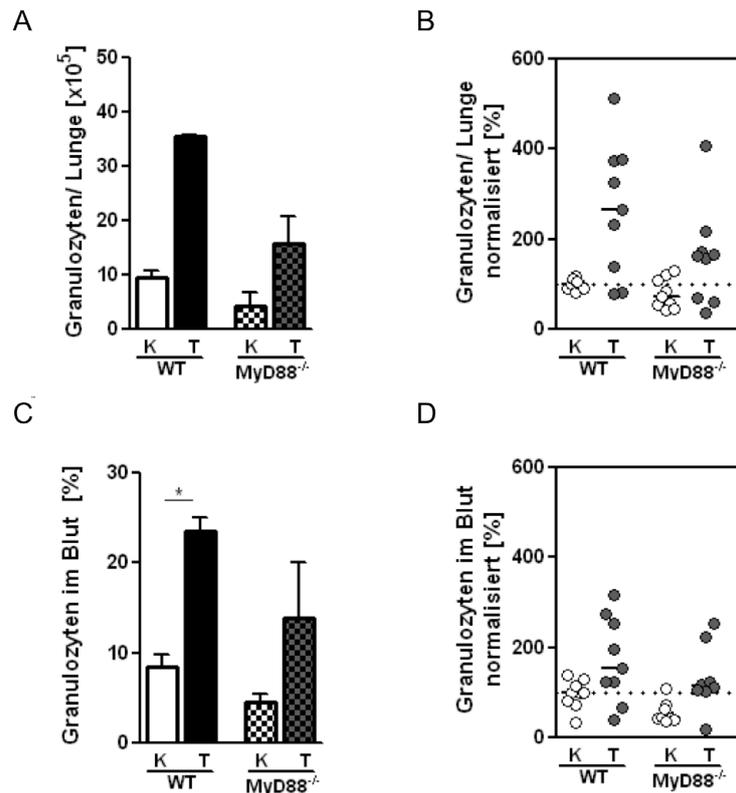
Granulozyten in der Lunge bzw. zu einem Rückgang der Granulozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Granulozyteneinwanderung in die Lunge nach Muskeltrauma von MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen wird im unteren Textabschnitt unter Kapitel 5.1.3.2 weiter beschrieben.



**Abb. 5.11 Unterschiedliche Granulozyteninfiltration in die Lunge von TLR4<sup>-/-</sup>- und TLR2,4<sup>-/-</sup>- Mäusen drei Stunden nach Trauma.** Dargestellt sind die absoluten Zahlen der durchflusszytometrischen Analyse von Granulozyten in der Lunge drei Stunden nach Muskeltrauma dargestellt mit Median und der Spannweite. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden statistisch mit dem ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal-Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test ermittelt.

### 5.1.3.2 MYD88<sup>-/-</sup>

In wie weit der Granulozyteneinstrom in die Lunge nach Trauma der Wadenmuskulatur abhängig von MyD88 verläuft, wurde nach Versuchsdurchführung unter Zuhilfenahme von MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen untersucht.



**Abb. 5.12 Granulozytenmuster der Lunge drei Stunden nach Trauma in MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen.** A + C Einzelbeispiel zur Granulozyteneinwanderung in die Lunge (A) und im Blut (C) von WT- (WT T= schwarzer Balken, WT K= offener Balken) und MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen (MyD88<sup>-/-</sup> T= schwarz kariierter Balken, MyD88<sup>-/-</sup> K= weiß kariierter Balken) drei Stunden nach Trauma, dargestellt mit Median und Spannweite. B + D Gepoolte Daten der Einzelexperimente (n= 3) zur Infiltration von Granulozyten in die Lunge (B) und ins Blut (D) normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment (T= graue Kreise, K= offene Kreise). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal-Wallis“-Test mit folgendem „Dunn’s post“-Test durchgeführt. P < 0,5 \* wird als signifikant erachtet.

In der Versuchsdurchführung unter Verwendung von Wildtyp- und MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen jeweils auf BALB/c- oder C57BL/6- Hintergrund, führte die Induktion des Weichteiltraumas auf die *Gastrocnemius*-Muskulatur beider Hinterläufe zu einer erhöhten Anzahl an Granulozyten in den Lungen verglichen mit den Tieren der jeweiligen Narkosekontrollgruppe (s. Abb. 5.12 A, B + C). In geringerem Maße wurde dieser Effekt auch im Blut sichtbar (s. Abb. 5.12 D + E). Generell zeigte die Auswertung der Daten von MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen der Trauma- sowie Kontrollgruppe niedrigere Granulozytenzahlen in der Lunge und im Blut als die der Wildtypmäusen. Der Granulozyten- Einstrom in die Lunge und auch die erhöhte Granulozytenzahl im Blut waren nicht MyD88- abhängig.

Zusammengefasst konnte nach Traumainduktion auf die Wadenmuskulatur bei BALB/c-, C57bl/6-, TLR4<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen auf zellulärer Ebene eine massive Erhöhung der Granulozytenzahl in der Lunge und im Blut mit einer maximalen Infiltration drei Stunden nach Trauma beobachtet werden. TLR2,4<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen eine tendenziell geringere Anzahl an Granulozyten in der Lunge nach Trauma im Vergleich zur Narkosekontrollgruppe. Der MFI für CD11b der gemessenen Granulozyten in der Lunge drei Stunden nach Trauma war in der Traumagruppe niedriger als in der Narkosekontrollgruppe. Die Anzahl an Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und CD3<sup>+</sup> T- Zellen waren zu dem Zeitpunkt eine Stunde und für Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten zusätzlich vier Tage nach Trauma erhöht. In den Populationen von Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten, AM, DC, NKT- und NK- Zellen konnte nach durchflusszytometrischer Analyse keine Veränderung im Vergleich Tiere mit und ohne Weichteiltrauma festgestellt werden.

---

## 5.2 GRANULOZYTENINFILTRATION, ROS UND S100

---

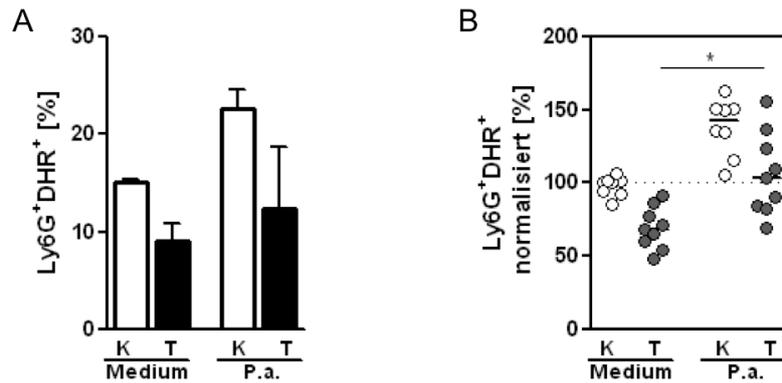
---

### 5.2.1 ROS

---

Zur Untersuchung mikrozyder ROS- Bildung durch Granulozyten in Bezug auf die Granulozyteninfiltration in die Lunge drei Stunden nach Weichteiltrauma wurden isolierte Lungenzellen wie in Kapitel 4.4.1.4 beschrieben inkubiert, mit Antikörpern behandelt und durchflusszytometrisch gemessen.

Die massive Granulozyteninfiltration in die Lunge drei Stunden nach Weichteiltrauma, korrelierte in diesem Traumamodell nicht mit einer erhöhten Produktion an Sauerstoffradikalen nach Traumatisierung, dargestellt in Abb. 5.13. Tendenzuell konnte ein geringerer DHR- Farbstoff- Umsatz in den Ly6G<sup>+</sup> - Zellen der Traumagruppe sowohl mit als auch ohne *in vitro Pseudomonas*- Stimulation im Vergleich zu den Tieren der Narkosekontrolle gemessen werden. Allerdings induzierte die Restimulation der Zellen mittels *P. aeruginosa* eine erhöhte ROS- Produktion im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

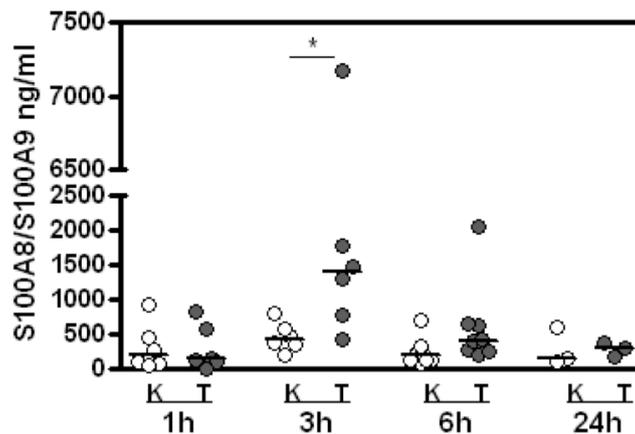


**Abb. 5.13 ROS- Produktion der Granulozyten drei Stunden nach Trauma.** Die isolierten Lungenzellen der Trauma- und Negativkontrollgruppe wurden in Medium kultiviert und zur Hälfte für eine Stunde mit UV- inaktivierten *P.aeruginosa*- Bakterien *in vitro* stimuliert. Nach Inkubation mit DHR 123 und Antikörperfärbung nach Ly6G, wurde die ROS- Produktion der Granulozyten durchflusszytometrisch erfasst. **A** Einzelbeispiel zur Darstellung der prozentualen Anzahl der Ly6G<sup>+</sup>DHR<sup>+</sup>- Zellen mit und ohne *in vitro Pseudomonas*- Stimulation drei Stunden nach Trauma (Traumatiere= schwarzer Balken, Kontrolltiere= offener Balken). **B** Gepoolte Daten der Einzelexperimente mit n= 3 der drei Stunden- Traumata normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment (T= graue Kreise, K= offene Kreise). Der Median ist als horizontale Linie für jede Versuchsgruppe dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht- parametrischen „Kruskal- Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test durchgeführt. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  \* erachtet.

## 5.2.2 S100A8/ S100A9

Die Analysen auf S100A8/ A9- Konzentrationen nach Weichteiltrauma im Serum von Mäusen wurden mittels ELISA- Methodik im Institut für Immunologie der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster unter Leitung von PD Dr. VOGL durchgeführt. Hierfür wurden Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma Blut entnommen und das gewonnene Serum an PD Dr. VOGL weitergeleitet.

In Anlehnung an die Zeitkinetik der Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Weichteiltrauma, konnte eine erhöhte Serum- S100A8/ S100A9- Konzentration zeitgleich mit dem Anstieg an Granulozyten in der Lunge gemessen werden. In der Abb. 5.14 werden die ermittelten ELISA- Ergebnisse der Zeitpunkte 1h, 3h, 6h und 24h dargestellt. Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma war die höchste Konzentration an S100A8/ S100A9- Protein im Serum sowie Anzahl an Granulozyten in der Lunge von Versuchstieren der Traumagruppe zu verzeichnen. Hierbei stieg die S100A8/ S100A9- Konzentration der Narkosekontrollgruppe von 425 ng/ml auf 1396,5 ng/pg der Traumagruppe.



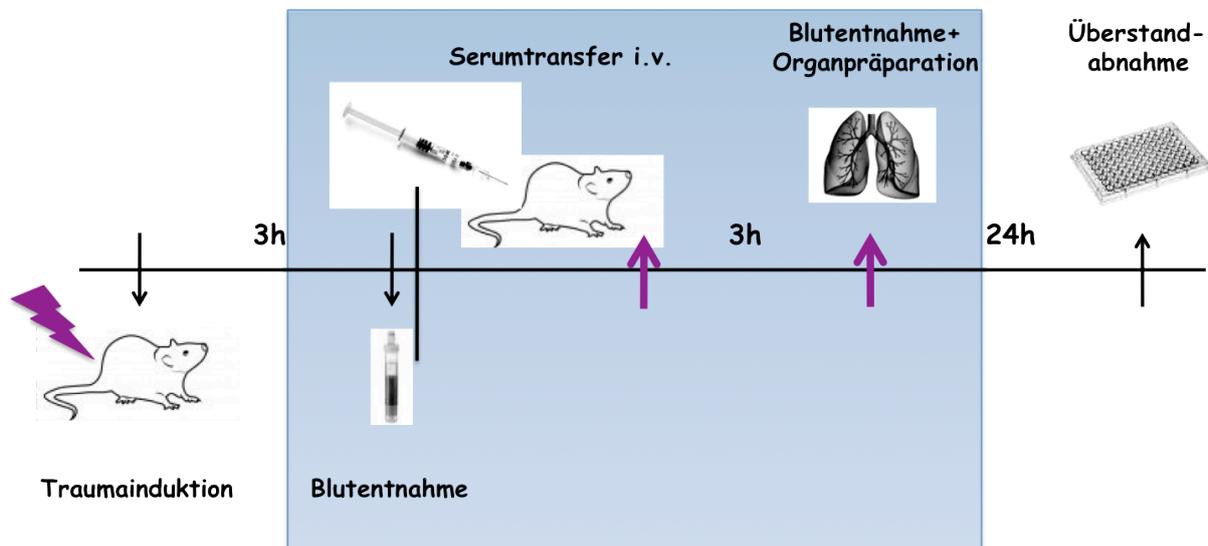
**Abb. 5.14 Erhöhte S100A8/ S100A9- Protein- Konzentration im Serum zeitgleich mit der Granulozyteninfiltration.** Zu den Zeitpunkten 1h, 3h, 6h und 24h nach Trauma wurde Serum der Versuchstiere gewonnen und in einer ELISA- Bestimmung in Kooperation mit PD Dr. VOGL an der Universität Münster die Konzentration an S100A8/ S100A9- Proteinen bestimmt. Dargestellt sind die S100- Serumkonzentration (Trauma= graue Kreise, Kontrolle= offene Kreise) zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die horizontalen Linien geben den Median an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des nicht- parametrischen „*Mann-Whitney U*“- Tests durchgeführt, wobei  $P < 0,5$  \* als signifikant erachtet wurde.

Das Weichteiltrauma auf die *Gastrocnemius*- Muskulatur von Mäusen induzierte eine signifikant gesteigerte Granulozyteninfiltration in die Lunge einhergehend mit einer gesteigerten S100A8/ S100A9- Serumkonzentration, welche jedoch nicht zu einer gesteigerten ROS- Produktion dieser Granulozyten führte. Mit und ohne *in vitro* Restimulation der Leukozyten aus der Lunge mit *P. aeruginosa* war die gemessene Population an Ly6G<sup>+</sup> DHR<sup>+</sup>- Granulozyten in der Lunge der Kontrollgruppen höher als der Traumagruppen, aber die Restimulation mit *P. aeruginosa* führte jeweils zu einer erhöhten Ly6G<sup>+</sup> DHR<sup>+</sup>- Zellzahl.

### 5.3 GRANULOZYTENINFILTRATION UND SERUMTRANSFER

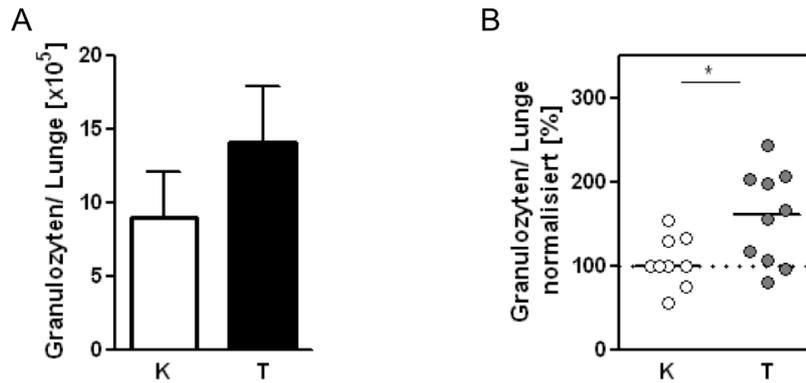
Blutserum dient im lebenden Organismus als Transportmedium für lösliche Kommunikationsmoleküle um verschiedene Botenstoffe an unterschiedlichen Lokalisationen im Körper zu verteilen. Zur Untersuchung ob lösliche Komponenten im Serum von Mäusen nach Weichteiltrauma an der vermehrten Infiltration von Granulozyten in die Lunge ohne direkte zelluläre Wechselwirkung beteiligt sind,

wurde Serum von Mäusen eines drei Stunden- Traumas in naive Versuchstiere, wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben, übertragen.



**Abb. 5.15 (modifizierte Abb. 4.6) Versuchsaufbau Serumtransfer.** Hervorgehoben wird die i.v.- Injektion von gewonnenem Serum aus Mäusen drei Stunden nach Trauma oder Narkosekontrolle in naive Tiere zur Analyse von Granulozyten in Blut und Lunge nach drei Stunden Inkubation.

Das verwendete Serum stammte von Tieren der Narkosekontrolle sowie von Mäusen drei Stunden nach Weichteiltrauma und wurde von je einem Versuchstier in eine naive Maus in einem Volumen von 100µl in die Schwanzvene injiziert. Die schematische Darstellung des Versuchsablaufs unter Hervorheben des Serumtransfers ist in Abb. 5.15 gezeigt. Die Applikation von Serum aus Tieren drei Stunden nach Trauma transferierte den Effekt der Granulozyteninfiltration auf naive Tiere. In der durchflusszytometrischen Analyse der Lungenzellen wurden mehr Ly6G<sup>+</sup>-Granulozyten in den Lungen der Mäuse nach Injektion von Serum der Spendertieren mit Muskeltrauma als bei den Versuchstieren, welche mit Serum der Kontrollgruppe behandelt wurden (s. Abb. 5.16).



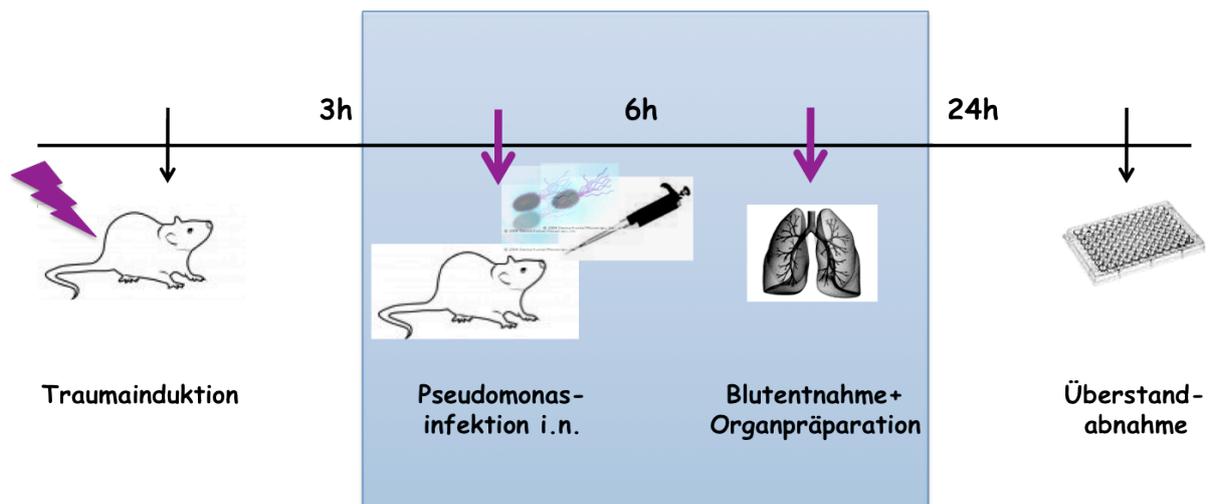
**Abb. 5.16 Transferierte Granulozyteninfiltration in die Lungen von naiven Tieren.** Drei Stunden nach Seruminjektion von Mäusen der Kontroll- und Traumagruppe eines drei Stunden-Traumas in naive Versuchstiere, wurde deren Blut und die Lungen durchflusszytometrisch auf eine veränderte Granulozytenzahl untersucht. In der Darstellung **A** sind die Granulozytenzahlen in der Lunge nach Serumtransfer von Mäusen mit (T= schwarzer Balken) und ohne Trauma (K= offener Balken) für ein Einzelexperimente dargestellt. **B** Gepoolte Granulozyten-Daten der Einzelexperimente normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment, wobei die grauen Kreise die Daten der Mäuse behandelt mit Serum der Traumagruppe präsentieren und die offenen Kreise die der Negativkontrollgruppe. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen „*Man-Whitney U*“- Tests durchgeführt.  $P > 0,5^*$  wurde als signifikant erachtet.

Das Serum von Mäusen drei Stunden nach Trauma transferierte eine Granulozyteninfiltration in die Lunge naiver Mäuse in etwas geringerem Maße, sonst jedoch analog zu der beobachteten Granulozyteneinwanderung bei den Mäusen drei Stunden nach Traumapplikation.

#### 5.4 CHARAKTERISIERUNG DER IMMUNMODULATION IN DER LUNGE NACH TRAUMA IM LUNGENINFEKTIONSMODELL

Dass ein geschlossenes, stumpfes Muskeltrauma eine systemische Immunmodulation zur Folge hat, konnte deutlich durch die zellulären Veränderungen in der Lunge nach Trauma, einem Organ entfernt der Weichteilschädigung, demonstriert werden. In unserem Traumamodell war in den vorausgegangenen Versuchen ohne sekundäre Infektion mit *Pseudomonas*- Bakterien (s. Kapitel 5.1) die Anzahl an Granulozyten in der Lunge eine Stunde bis sechs Stunden nach Traumainduktion deutlich erhöht, jedoch nicht die der NK- Zellen. Die maximale Granulozyteninfiltration in die Lunge ohne Sekundärinfektion war drei Stunden nach Durchführung des Muskeltraumas erreicht.

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Auswirkungen einer Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* - Bakterien im Zusammenspiel mit der Immunmodulation in der Lunge nach Weichteiltrauma betrachtet, besonders in Hinblick auf die signifikante Granulozyteninfiltration, die mit weiteren pulmonalen zellulären Veränderungen einhergeht. Dazu wurden die Versuchstiere drei Stunden und vier Tage nach Traumainduktion i.n. mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa* infiziert (s. Kapitel 4.5.3) und sechs Stunden später Blut und Lunge der Mäuse zur Zellanalyse herangezogen (s. Abb. 5.17).

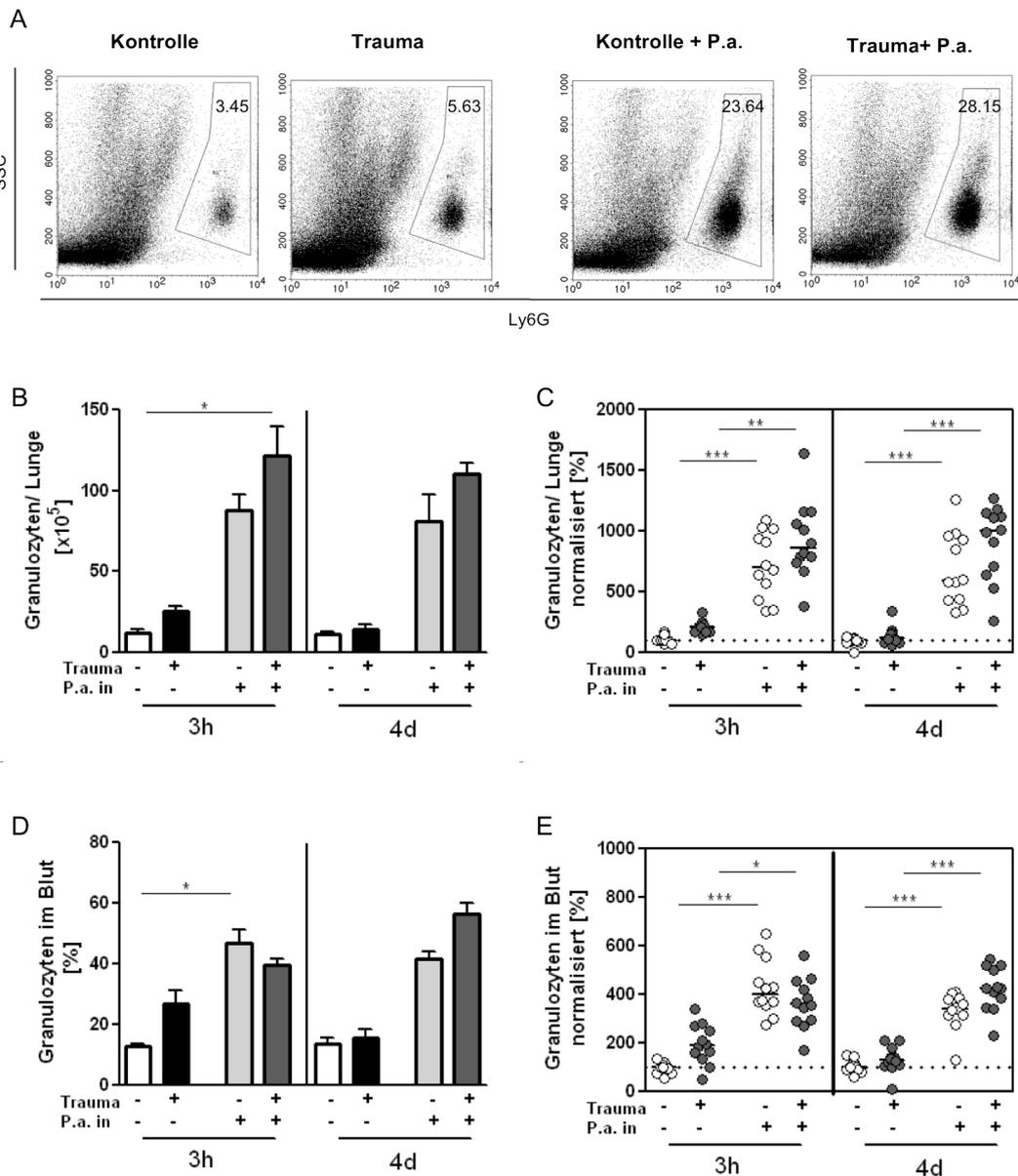


**Abb. 5.17 (modifizierte Abb. 4.7) Versuchsaufbau des Lungeninfektionsmodell.** Hervorgehoben wird die i.n.- Applikation von UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien in Versuchstiere drei Stunden (oder vier Tage) nach Trauma. Sechs Stunden nach Infektion wurde den Versuchstieren Blut entnommen und die Organe präpariert.

#### 5.4.1 MODULATION DER GRANULOZYTENZAHL NACH TRAUMA IM INFEKTIONSMODELL

Drei Stunden sowie vier Tage nach Trauma konnte ein massiver Einstrom an Granulozyten in die Lunge der *Pseudomonas*- infizierten Mäusen, im Vergleich zur nicht- infizierten Kontrollgruppe, durchflusszytometrisch gemessen werden (s. Abb. 5.18 A). Jedoch bestand kein Unterschied in der Anzahl an Granulozyten zwischen den Mäusen mit und ohne Muskeltrauma nach der Infektion mit UV-inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien (s. Abb. 5.18 B - E). Die gemessene Granulozytenzahl stieg drei Stunden nach Trauma im Vergleich der Mediane der normalisierten Werte von der nicht infizierten Narkosekontrollgruppe und denen der bakteriell- infizierten

Mäuse in der Traumagruppe um das 8,6 fache, sowie in der Kontrollgruppe um das 7 fache und vier Tage nach Trauma in der Traumagruppe um das 10 fache, sowie in der Kontrollgruppe um das 6 fache an (s. Abb. 5.18 C). Im Blut belief sich die Infiltration von Granulozyten nach *P. aeruginosa*- Infektion um das 3,5 bis 4 fache nach drei Stunden sowie vier Tagen nach Trauma (s. Abb. 5.18 E). Wobei auch hier in der Anzahl an Ly6G<sup>+</sup>- Granulozyten kein signifikanter Unterschied zwischen der Traumaversuchsgruppe und Narkosekontrollgruppe nach *P. aeruginosa*- Infektion in Lunge oder Blut verzeichnet werden konnte.



**Abb. 5.18 Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Trauma und Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa*.** **A** Dotplot- Darstellung der gemessenen Granulozytenanzahlen in der Lunge drei Stunden nach Trauma und nachfolgender sechsständiger *Pseudomonas*-Infektion. **B + D** Einzelbeispiel zur Granulozyteneinwanderung in die Lunge (**B**) und das Blut (**D**) mit (T + P.a. = dunkelgrauer Balken, K + P.a. = hellgrauer Balken) und ohne *Pseudomonas*- Infektion (T= schwarzer Balken, K= offener Balken) drei Stunden sowie vier Tage nach Trauma. Die Graphen sind mit Median und Spannweite dargestellt. **C + E** Gepoolte Daten der Einzelerperimente (n= 4) zur Infiltration von Granulozyten in die Lunge (**C**) und ins Blut (**E**) normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment (T= graue Kreise, K= offene Kreise). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal- Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test durchgeführt. Als signifikant wurden  $p < 0,5$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\* erachtet.

---

## 5.4.2 ZUSAMMENSETZUNG WEITERER IMMUNZELLEN IN DER LUNGE NACH TRAUMA IM INFEKTIONSMODELL

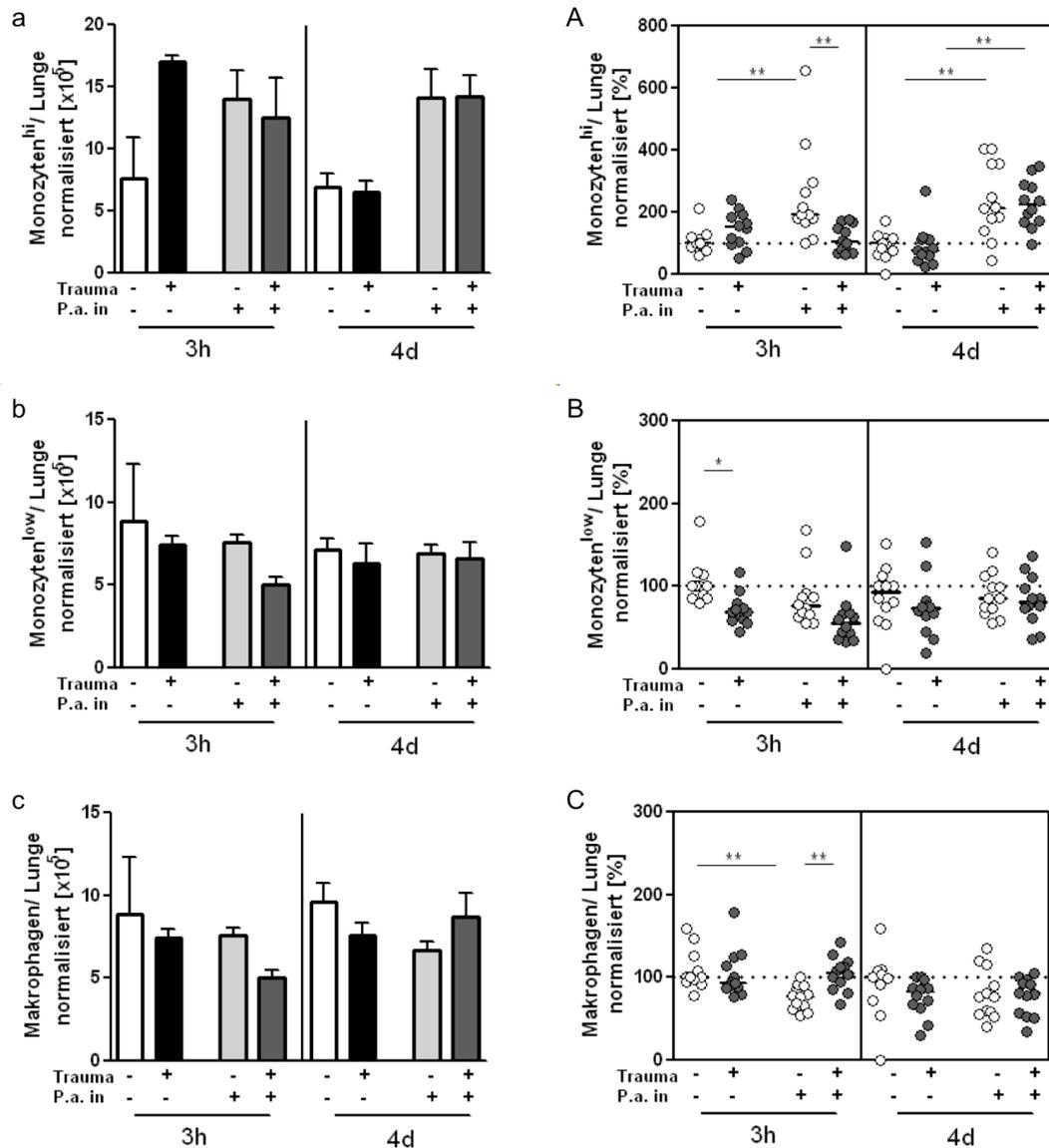
---

Zur vollständigen Übersicht über die Zellzusammensetzung in der Lunge nach Weichteiltrauma im Lungeninfektionsmodell werden die restlichen Zellen vorgestellt, jedoch nicht weiter in der Diskussion betrachtet.

### 5.4.2.1 MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN

---

In diesem Traummodell drei Stunden und vier Tage nach Trauma und nachfolgender Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* konnten unterschiedliche Verhaltensmuster von Monozyten in den Subgruppen Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>low</sup> sowie CD11c<sup>low</sup> CD11b<sup>intermediär</sup>- Makrophagen beobachtet werden. Die durchflusszytometrisch gemessene Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>hi</sup>- Anzahl stieg signifikant in der *Pseudomonas*- infizierten Trauma- sowie der Kontrollgruppe vier Tage nach Trauma an, was hingegen im drei Stunden- Trauma nur in der Narkosekontrollgruppe nach bakterieller Infektion ersichtlich war (s. Abb. 5.19 a, A). Dies korrelierte mit einem geringen Abfall der Zellzahl an Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>low</sup> nach Infektion mit *P. aeruginosa* drei Stunden sowie vier Tage nach Trauma (s. Abb. 5.19 a, B). Die Anzahl an Makrophagen war nur in der *Pseudomonas*- infizierten Negativkontrollgruppe signifikant erniedrigt. In der durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagen des vier Tage- Traumas war kein Effekt der *P. aeruginosa*- Infektion oder der Traumainduktion wahrzunehmen (s. Abb. 5.19 c, C).

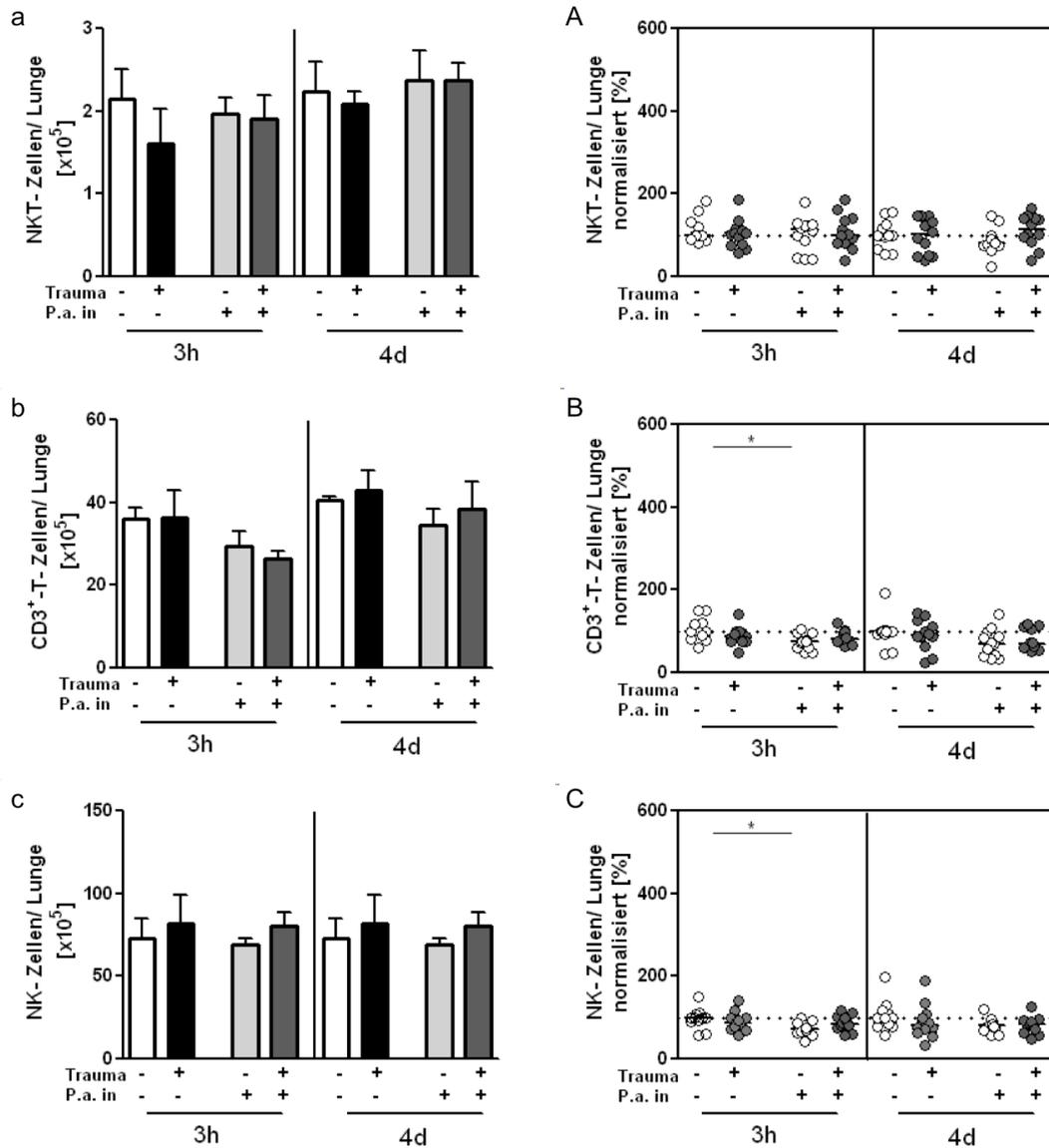


**Abb. 5.19 Anzahl an Monozyten und Makrophagen in der Lunge nach Trauma und *Pseudomonas*- Infektion.** Drei Stunden und vier Tage nach Trauma wurden die Versuchstiere i.n. mit *P. aeruginosa* infiziert und nach sechsständiger Inkubation die Zellzahlen aus der Lunge ermittelt. Darstellung der Monozyten in ihren Subpopulationen (**A, a**) Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>- Monozyten<sup>hi</sup> und (**B, b**) Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup>- Monozyten<sup>low</sup> sowie (**C, c**) CD11c<sup>low</sup> CD11b<sup>intermediär</sup>- Makrophagen in einer auf den Median von K für jedes Experiment normalisierten Zeitkinetik (**A - C**) (T= graue Kreise, K= offene Kreise, ) mit jeweils einem Einzelbeispiel (**a - c**) (T= schwarzer Balken, K= offener Balken, T + P.a. = dunkelgrauer Balken, K + P.a. = hellgrauer Balken) zu den Zeitpunkten drei Stunden und vier Tage nach Trauma. Die Zellzahlen in den Einzelbeispielen sind abgebildet als Median mit Spannweite und in den normalisierten Darstellungen ist der Median mittels einer horizontalen Linie pro Versuchsgruppe markiert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal- Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test durchgeführt. Als signifikant wurden p < 0,5 \* und p < 0,01 \*\* erachtet.

#### 5.4.2.2 NKT-, CD3<sup>+</sup>- T- UND NK- ZELLEN

---

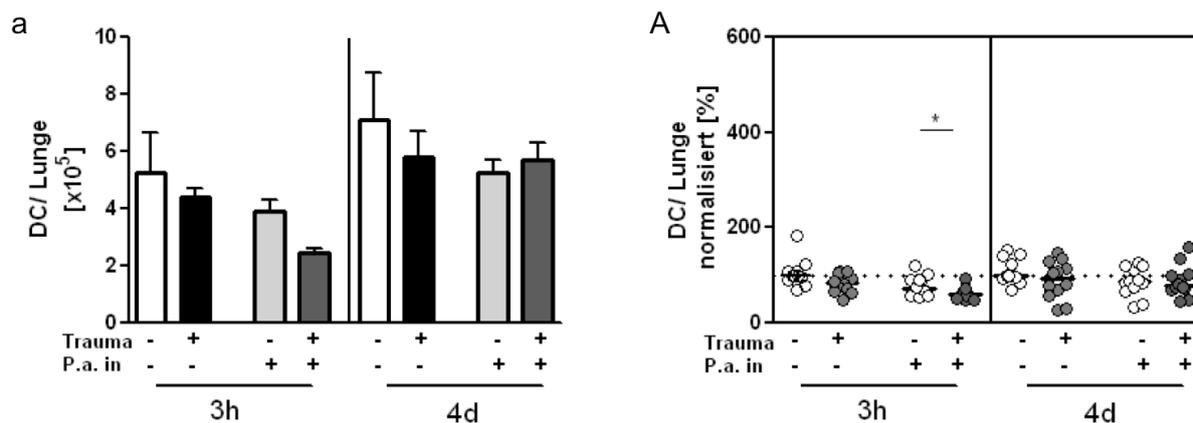
Vier Tage nach Traumainduktion und sechsstündiger Infektion mit UV- inaktivierten *Pseudomonas*- Bakterien wurde in der Anzahl an CD3<sup>+</sup>- T- Zellen und NK- Zellen und drei Stunden sowie vier Tage nach Trauma der Anzahl an NKT- Zellen kein Unterschied zu den nicht- infizierten Tieren ermittelt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde eine Verringerung der CD3<sup>+</sup>- T- und NK- Zellzahl in der Narkosekontrollgruppe nach Infektion mit *P. aeruginosa* gemessen. In der Abb. 5.20 werden die Anzahl an NKT-, CD3<sup>+</sup>- T-, NK- Zellen mit und ohne Traumainduktion im Lungeninfektionsmodell dargestellt.



**Abb. 5.20** Anzahl an NKT-, CD3<sup>+</sup>-T- und NK-Zellen in der Lunge nach Trauma und *Pseudomonas*-Infektion. Drei Stunden und vier Tage nach Trauma wurden die Versuchstiere i.n. mit *P. aeruginosa* infiziert und nach sechsständiger Inkubation die Zellzahlen aus der Lunge ermittelt. Darstellung der (A, a) NKT-Zellen (B, b) CD3<sup>+</sup>-T-Zellen sowie (C, c) NK-Zellen in einer auf den Median von K für jedes Experiment normalisierten Zeitkinetik (A - C) (T= graue Kreise, K= offene Kreise, ) mit jeweils einem Einzelbeispiel (a - c) (T= schwarzer Balken, K= offener Balken, T + P.a. = dunkelgrauer Balken, K + P.a. = hellgrauer Balken) zu den Zeitpunkten drei Stunden und vier Tage nach Trauma. Zellzahlen in den Einzelbeispielen sind abgebildet als Median mit Spannweite und in den normalisierten Darstellungen ist der Median mittels einer horizontalen Linie pro Versuchsgruppe markiert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal-Wallis“-Test mit folgendem „Dunn’s post“-Test durchgeführt. Als signifikant wurde  $p < 0,5$  \* erachtet.

## 2.1.2.1 DENDRITISCHE ZELLEN

Die Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* drei Stunden nach Trauma führte in der Gruppe der Tiere nach induziertem Muskeltrauma zu einer Erniedrigung der Anzahl an DCs im Vergleich zur Narkosekontrollgruppe mit und ohne Infektion. Vier Tage nach Trauma war kein Unterschied zwischen den infizierten und nicht-infizierten Versuchstieren zu verzeichnen (s. Abb. 5.21).



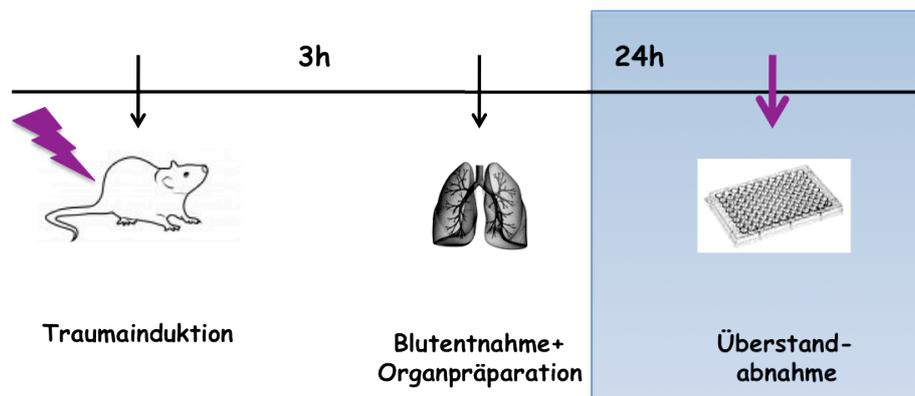
**Abb. 5.21 Anzahl an DCs in der Lunge nach Trauma und *Pseudomonas*- Infektion.** Drei Stunden und vier Tage nach Trauma wurden die Versuchstiere i.n. mit *P. aeruginosa* infiziert und nach sechsstündiger Inkubation die Zellzahlen aus der Lunge ermittelt. Darstellung der DCs in einer auf den Median von K normalisierten Zeitkinetik für jedes Experiment (A) (T= graue Kreise, K= offene Kreise, ) mit jeweils einem Einzelbeispiel (a) (T= schwarzer Balken, K= offener Balken, T + P.a. = dunkelgrauer Balken, K + P.a.= hellgrauer Balken) zu den Zeitpunkten drei Stunden und vier Tage nach Trauma. Die Zellzahlen in den Einzelbeispielen sind abgebildet als Median mit Spannweite und in der normalisierten Darstellung ist der Median mittels einer horizontalen Linie pro Versuchsgruppe markiert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal- Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test durchgeführt. Als signifikant wurde  $p < 0,5$  \* erachtet.

Zusammenfassend führt die i.n.- Infektion mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien zu einer massiven Infiltration von Granulozyten in die Lunge (6 - 10 fache erhöht) und dem Blut (3 - 4 fach), gleichermaßen bei Tieren nach Traumaapplikation sowie der Narkosekontrolle. Die Infektion drei Stunden nach Trauma induziert einen Anstieg der  $\text{Ly6C}^{\text{hi}} \text{Ly6G}^-$  Monozyten<sup>hi</sup>- Anzahl und einen Abfall der Anzahl von AM,  $\text{CD3}^+$ -T- Zellen und NK- Zellen der Narkosekontrolle, wohingegen die Anzahl der  $\text{Ly6C}^{\text{low}} \text{Ly6G}^-$  Monozyten<sup>low</sup> und DCs der Narkosekontrolle ebenso wie die der Traumagruppe nach Infektion tendenziell erniedrigt waren. Die durchflusszytometrisch gemessene Zellzahl von NKT- Zellen blieb drei Stunden nach Trauma unverändert nach Infektion oder Traumainduktion. Vier Tage nach

Weichteiltrauma der Wadenmuskulatur waren signifikant mehr Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>hi</sup> in den Lungen von infizierten Tieren der Narkosekontrolle und Traumagruppe zu verzeichnen als bei nicht- infizierten Tieren, wobei die Infektion mit Pseudomonaden keinen Einfluss auf die Populationen von Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten<sup>low</sup>, CD11c<sup>low</sup> CD11b<sup>intermediär</sup>- AM, NKT- Zellen, CD3<sup>+</sup>-T- Zellen, NK-Zellen und DCs hatte.

## 5.5 TRAUMA, GRANULOZYTENREKRUTIERUNG UND INFEKTABWEHR

Zur Untersuchung der Chemokin- und Zytokinmuster kultivierter Lungenzellen von Tieren nach Weichteiltrauma und nach *in vitro* Stimulation mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien wurden den Versuchstieren drei Stunden nach Trauma-induktion bzw. Narkosekontrolle die Lungen entnommen und die isolierten Zellen für 18- 22 Stunden kultiviert. Der Überstand wurde mittels ELISA wie in Abb. 5.22 dargestellt auf die Zytokine KC, MIP- 2, IL- 6, IFN- $\gamma$  und IL- 10 analysiert.

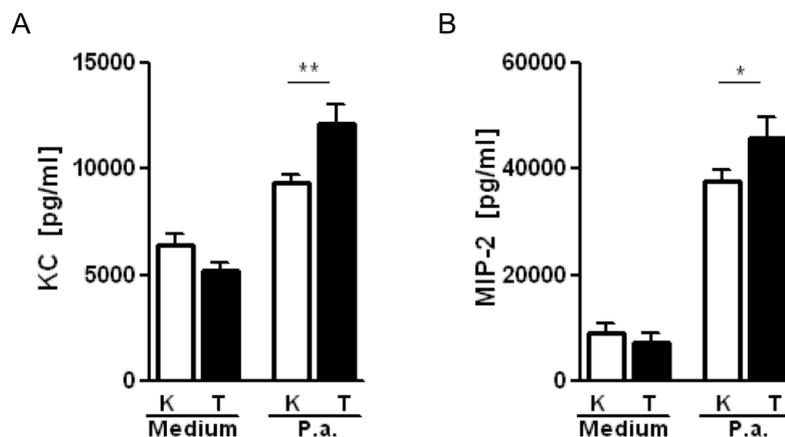


**Abb. 5.22 (modifizierte Abb. 4.5) Analyse der Zytokinkonzentration mittels ELISA nach Zellkultivierung.** Hervorgehoben wird die Ermittlung des Zytokinmusters in der Lungenkultur mittels ELISA. Die für 18- 22 Stunden kultivierten Lungenzellen entstammten Versuchstieren drei Stunden nach Trauma oder Narkosekontrolle.

Die durchflusszytometrische Messung DHR<sup>+</sup> Granulozyten erfolgte nach Isolierung der Lungenzellen, Inkubation und Antikörperfärbung der Zellen wie in Kapitel 4.4.1.4 beschrieben.

### 5.5.1 CHEMOTAKTISCHE FAKTOREN KC UND MIP- 2

In dem hier angewandten Traumageschehen korrelierte die Infiltration der Lunge mit Granulozyten drei Stunden nach Trauma mit einem tendenziellen Anstieg der Chemokine KC und MIP- 2 in der Traumagruppe nach Restimulation mit *P. aeruginosa*. Das Trauma alleine induzierte keine signifikant veränderte Zytokinexpression. In Abb. 5.23 werden die analysierten Werte für KC und MIP- 2 dargestellt.



**Abb. 5.23 Chemokinmuster kultivierter Lungenzellen.** Drei Stunden nach Traumainduktion wurden die Lungenzellen isoliert und in An- bzw. Abwesenheit von UV-inaktivierten *P. aeruginosa* für 18 - 22 Stunden kultiviert. Mittels ELISA fand eine Analyse der Chemokine KC und MIP- 2 statt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Chemokine in pg/ml aus den Triplikat-Ansätzen zusammengefasst von mindestens 2 Experimenten. Die Abweichungen zwischen den Traumatieren und den Tieren der Narkosekontrolle wurde mittels eines „one-way ANOVA“-Test und nachfolgendem „Newman-Keuls“- Tests analysiert. Als signifikant wurde  $P < 0,05$  \*und  $P < 0,01$  \*\* erachtet.

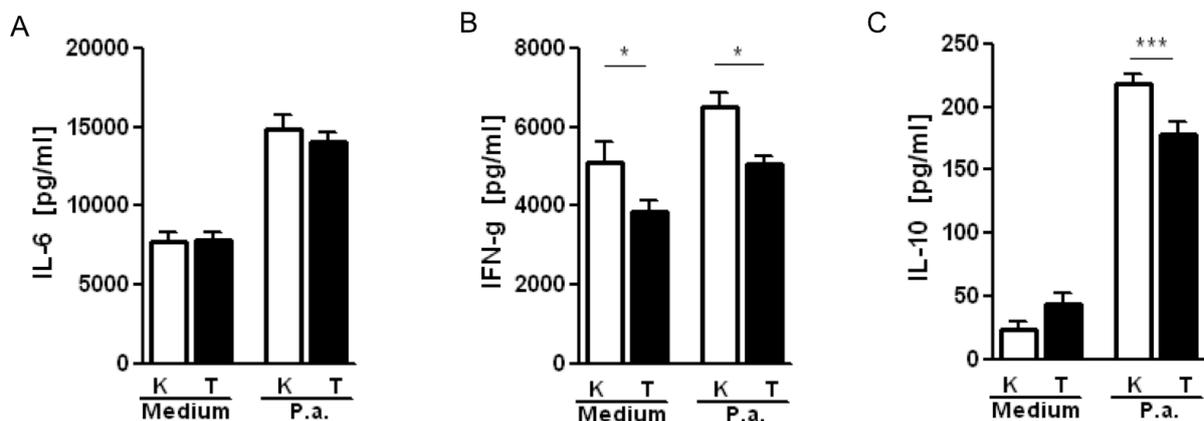
### 5.5.2 INFEKTABWEHR DER LUNGE NACH TRAUMA

#### 5.5.2.1 ZYTOKINMUSTER IN DER LUNGE NACH TRAUMA UND *IN VITRO* RESTIMULATION MIT *P. AERUGINOSA*

Das induzierte Weichteiltrauma auf die Hinterbeinmuskulatur von Mäusen in diesem Versuchsmodell sowie eine Restimulation der Zellen mittels *P. aeruginosa* führte drei Stunden nach Trauma zu keiner veränderten IL- 6- Sekretion in der Lunge. Die Konzentration an IL-6 gemessen mittels ELISA in den Überständen der Lungenkulturen der Trauma- sowie der Kontrolltiere differenzierten sich nicht voneinander (s. Abb. 5.24 A).

*P. aeruginosa* hatte keine massive stimulierende Wirkung zur IFN- $\gamma$ -Produktion auf Lungenzellen in Kultur. Jedoch zeigten die Zellen in der Mediumkultur sowie der restimulierten Kultur mit *P. aeruginosa* eine deutlich verminderte Sekretion von IFN- $\gamma$  in der Traumagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe drei Stunden nach Traumatisierung der *Gastrocnemius*-Muskulatur (s. Abb. 5.24 B).

Das in dieser Arbeit angewendete Weichteiltraumamodell alleine führte zu keiner signifikant veränderten IL-10-Konzentration in der Lungenkultur der traumatisierten Mäuse im Vergleich zu der Narkosekontrolle drei Stunden nach Trauma. Jedoch nach Restimulation der isolierten Leukozyten aus der Lunge mit *P. aeruginosa in vitro* sezernierten die kultivierten Zellen von Mäusen nach Trauma signifikant weniger IL-10 als die der Kontrollgruppe (s. Abb. 5.24 C).

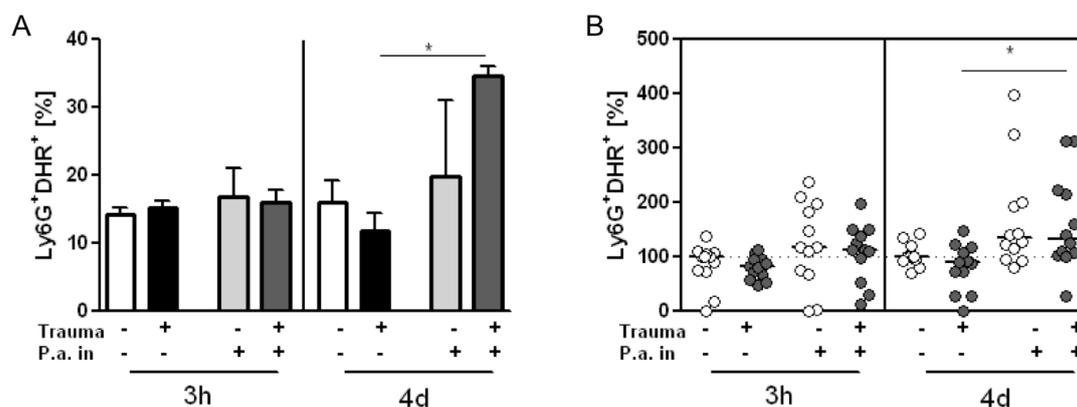


**Abb. 5.24 Zytokinmuster kultivierter Lungenzellen.** Drei Stunden nach Trauma-induktion wurden die Lungenzellen isoliert und in An- bzw. Abwesenheit von UV-inaktivierten *P. aeruginosa* für 18 - 22 Stunden kultiviert. Mittels ELISA fand eine Analyse der Zytokine statt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Zytokine in pg/ml aus den Triplikat-Ansätzen zusammengefasst von mindestens 2 Experimenten. Die Abweichungen zwischen den Traumatizierten und den Tieren der Narkosekontrolle wurde mittels eines „one-way ANOVA“-Test und nachfolgendem „Newman-Keuls“-Tests analysiert. Als signifikant wurde  $P < 0,05$  \*,  $P < 0,01$  \*\* und  $P < 0,001$  \*\*\* erachtet.

Die ELISA-Analysen zu den Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie die durchflusszytometrischen Messungen der intrazellulär-gemessenen Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  führten zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen.

5.5.2.2 TRAUMA, *P. AERUGINOSA*- INFEKTION *IN VIVO* UND ROS

Wie in Kapitel 5.2.1 gezeigt, induzierte das Trauma der *Gastrocnemius*-Muskulatur in Mäusen keine erhöhte Produktion an ROS durch Granulozyten. Jedoch nach Weichteiltrauma und *in vivo* Infektion mit UV-inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien stieg die Anzahl an Granulozyten in den Lungen von Tieren der Narkosekontrollgruppe sowie der Traumagruppe massiv an (s. Abb. 5.18), was auch zu einer tendenziell erhöhte ROS- Produktion führte, angezeigt durch DHR<sup>+</sup>- Zellen (s. Abb. 5.25 A + B). Vier Tage nach Trauma mit anschließender sechsständiger Infektion mit *P. aeruginosa* war die Differenz der ROS- Produktion zwischen der Traumagruppe mit Infektion zur nicht- infizierten Versuchsgruppe mit Weichteiltrauma signifikant.



**Abb. 5.25 Steigerung der ROS- Produktion mit Anstieg der Granulozytenzahl nach *Pseudomonas*- Infektion.** Die isolierten Lungenzellen der Trauma- und Kontrollgruppe mit und ohne Infektion wurden in Medium kultiviert. Nach Inkubation mit DHR 123 und Antikörperfärbung nach Ly6G, wurde die ROS- Produktion der Granulozyten durchflusszytometrisch erfasst. **A** Einzelbeispiel zur Darstellung der prozentualen Anzahl der Ly6G<sup>+</sup> DHR<sup>+</sup>- Zellen mit und ohne *in vivo* *P. aeruginosa*- Infektion drei Stunden und vier Tage nach Trauma (T= schwarzer Balken, K= offener Balken, T + P.a. = dunkelgrauer Balken, K + P.a. = hellgrauer Balken). **B** Gepoolte Daten der Einzelerperimente mit n= 4 je Zeitpunkt normalisiert auf den Median von K für jedes Experiment (T= graue Kreise, K= offene Kreise). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen „Kruskal- Wallis“- Test mit folgendem „Dunn’s post“- Test durchgeführt. Als signifikant wurde p < 0,05 \* erachtet.

Zusammengefasst führte Restimulation kultivierter Lungenzellen von Mäusen der Narkosekontrolle sowie der Traumagruppe mittels *P. aeruginosa in vitro* zu einer vermehrten Sekretion der Chemokine KC und MIP- 2, aber auch des antiinflammatorischen Zytokins IL- 10. Hierbei sezernierten die Immunzellen aus der

Lunge von Mäusen nach Traumainduktion und Restimulation signifikant vermehrt KC und MIP- 2 und erniedrigte Werte an IL- 10. Die Applikation des Weichteiltraumas sowie die Restimulation mit Pseudomonaden in der Lungenkultur hatten keinen Einfluss auf die Sekretion von IL- 6. IFN-  $\gamma$  wurde jeweils in den Lungen der Versuchsgruppe nach Traumainduktion mit und ohne *in vitro* Restimulation signifikant weniger produziert als in der Narkosekontrollgruppe. Die *in vivo* Infektion von Versuchstieren mit UV- inaktivierten Pseudomonaden spiegelte sich in einer massiven Granulozyteninfiltration in die Lungen der Mäuse wider, welche mit einer tendenziell erhöhten Produktion an ROS korrelierte. Vier Tage nach Traumainduktion und *in vivo* Infektion wurde signifikant mehr DHR von Ly6G<sup>+</sup>- Granulozyten traumatisierter Tiere umgesetzt als in der infizierten Narkosekontrollgruppe.

## 6 DISKUSSION

---

Verletzungen von Gewebestrukturen und Organen heterogener Ursachen führen zu einer lokalen sowie systemischen Modulation des Immunsystems. Mit einer inflammatorischen Immunreaktion [290, 291] geht eine Phase der Immunsuppression einher [292, 293], in welcher der Organismus anfälliger für sekundäre Infektionen ist [360, 399]. Führen diese kontraregulatorischen Mechanismen nicht zu einer immunologischen Balance, kommt es zu einer Entgleisung der Immunantwort [296, 297]. Diese sogenannte Hyperinflammation kann zu frühem Multiorganversagen (engl. *multi organ failure*, MOF) führen [321, 332]. Durch Immunsuppression begünstigte Sekundärinfektionen können zu spätem MOF führen [323-325], auch in Organen fern des inzidentiellen Traumageschehens [289, 298].

Die klinische Versorgung schwerverletzter Patienten, Mensch wie Tier, wird wegen der unterschiedlichen Ausprägungen der Immunmodulation und der Vielfalt an möglichen Komplikationen stark erschwert. In der wissenschaftlichen Forschung bleibt es eine große Herausforderung, diese flexiblen und hochgradig variablen Prozesse zu analysieren und Ansätze zur Verbesserung der klinischen Behandlungsmethoden zu entwickeln. Auswirkungen traumatischer Geschehen auf das Immunsystem wurden intensiv an Traumamodellen wie Hämorrhagischem Schock, Fraktur und Verbrennungen u.a. auch in Zusammenhang mit MOF untersucht [375, 425-427]. In Bezug auf Weichteiltrauma ist noch wenig bekannt, wobei gerade diese Verletzungsform bei fast allen Operationen und Unfällen auftritt [318, 399, 403].

Es ist erwiesen, dass es nach verschiedenen systemischen sowie lokalen traumatischen und septischen Geschehen zu einer veränderten und sogar beeinträchtigenden Immunlage in der Lunge kommt [362, 363, 398, 428]. Wie aus der Literatur bekannt, kommt es nach massiven extrapulmonalen Traumata zu einer Immunmodulation [17, 125, 358, 429], die sich über z.T. noch unbekannt Umstände auf die Lunge [430, 431] ausweitet und im Rahmen der Inflammation ein *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) auslösen kann. Gleichzeitig erhöht sich die Infektanfälligkeit aufgrund der eintretenden Immunsuppression. Die Pathologie dieses Geschehen ist noch nicht vollständig verstanden [362, 432]. Es gibt

verschiedene *in vivo* Tierversuchsmodelle, wie z.B. mesenteriale Ishämie/Reperfusion [433], Hämorrhagischer Schock [434], Knochenfraktur [402], Trauma des Hinterbein durch Explosion („blast trauma“) [435], Verbrennung [436], experimentelle Pankreatitis [437] oder Kombination einzelner Traumata als Polytrauma [426, 438], die sich speziell mit der immunologischen Veränderung in der Lunge nach Traumatisierung beschäftigen. Allerdings hat jedes einzelne Traumageschehen eine spezifische Immunmodulation zur Folge [364, 403, 404, 425, 439].

In dieser Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Skelettmuskeltrauma auf die *Gastrocnemiusmuskulatur* von Mäusen wie in dieser Arbeit verwendet zu einer Einwanderung von Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) in den traumatisierten Muskel führt und in einer Verschiebung der lokalen Homöostase resultiert bis hin zu einer Immunsuppression im drainierenden Lymphknoten (unpublizierte Daten). Im Versuchsmodell führt dies zu einer verminderten Immunabwehr in der Lunge von Traumatieren gegenüber einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien. Diese Mechanismen geben Anlass zur Vermutung, dass auch weitere Zell- sowie Organsysteme von der Immunmodulation nach stumpfem Weichteiltrauma betroffen sind.

In wie weit sich Immunmodulation durch ein Skelettmuskeltrauma auf die Lunge auswirkt, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit wird in einem ersten Überblick die immunologischen Veränderung in der Lunge nach stumpfem Weichteiltrauma des *M. gastrocnemius* an Hand eines Mausmodells untersucht und durch Charakterisierung von Zellen und Zytokinen erfasst. Weiterführend wird die Auswirkung einer Lungeninfektion mit UV-inaktivierten *P. aeruginosa* nach diesem extrapulmonalen Weichteiltrauma in der Lunge untersucht.

## 6.1 GRANULOZYTENINFILTRATION NACH WEICHTEILTRAUMA

---

Das experimentelle Muskeltrauma auf die Wadenmuskulatur von Mäusen führt zu einer Zerstörung der Muskelfaseranordnung mit Einblutungen in die Muskulatur. In Folge des Traumas sterben einige Muskelfasern ab. Diese Muskelschäden sind ähnlich zu toxininduzierten Muskelverletzungen [440]. Zu keinem Zeitpunkt nach

Trauma kann eine klinische pulmonale Auswirkung wie Atemnot, verstärkte abdominale Atmung oder Husten beobachtet werden. Auch im Infektionsmodell nach intra nasaler (i.n.) Infektion der Mäuse mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa* zeigen die infizierten Tiere keine klinischen Befunde im Vergleich zu der nicht-infizierten Kontrollgruppen. Die offensichtlichen Vitalfunktionen wie Nahrungsaufnahme, Kot-, Urinabsatz, Pflegeverhalten und Aktivität, eingeschlossen Nestbau, sind nicht beeinträchtigt.

Trotz der fehlenden klinischen Beeinträchtigung der Versuchstiere durch das applizierte Weichteiltrauma führt dieses zu Veränderungen auf immunologischer Ebene. Granulozyten infiltrieren in die Lunge traumatisierter Mäuse, einem Organ fernab des eigentlichen Traumas. In der Literatur werden Granulozyten als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr [381, 383, 441] als einer der ersten Hauptinfiltratoren in die Lunge nach Trauma angesprochen. Auch in anderen Traumamodellen mit peripheren Traumata wie Frakturen, Pseudofrakturen, stumpfen Skelettmuskelverletzungen und Verbrennungen oder Hämorrhagischem Schock kommt es zu einer signifikanten gesteigerten Granulozytenanzahl in der Lunge verglichen mit der Kontrollgruppe [442-445]. Der Unterschied der oben erwähnten Traumamodelle im Vergleich zu dem in dieser Arbeit angewendeten Trauma besteht bei Hämorrhagischem Schock in der direkten systemischen Wirkung durch die erzielte Hypovolämie, bei Verbrennungen unterschiedlicher Schweregrade in der thermischen Beeinträchtigung und hochgradigen Prädisposition für Infektionen durch Hautverlust und somit der oberflächlichen Pathogenbarriere, und bei Fraktur/Pseudofraktur in der massiven immunologischen Wirkung durch Exposition des Gewebes mit Knochenkomponenten wie Knochenmarkszellen und Knochenmarksflüssigkeit. Das erwähnte Modell mit Skelettmuskelverletzung von KOBBE und Mitarbeitern ist am ehesten mit dem hiesigen Weichteiltrauma vergleichbar [444]. Jedoch wird in diesem deutlich massiveren Trauma die komplette Oberschenkelmuskulatur mit einer Klemme für 30 Sekunden mit hochgradiger Gewebe- und Gefäßzerstörung zerquetscht. Außerdem werden die Untersuchungen an C3H/HeOuJ wie C3H/HeJ Mäusen durchgeführt und die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität als Maß der Granulozyteninfiltration in die Lunge ermittelt. MPO ist ein Enzym, welches häufig zur Granulozytenmessung verwendet wird. Es wird jedoch auch von anderen Zellen wie Makrophagen gebildet und ist somit nicht spezifisch für

Granulozyten [446]. Die Anzahl an Granulozyten kann durch die Messung der MPO-Aktivität nicht exakt wiedergegeben werden, im Gegensatz zur FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse. Durch die durchflusszytometrische Messung der Granulozyten in dieser Arbeit sind die Daten spezifischer als in dem Traumamodell von KOBBE und Mitarbeiter [444].

In Geweben generell, aber auch in der Lunge, dienen Granulozyten der Abwehr von Pathogenen und tragen nach Verletzungen zur Geweberegeneration bei. Unter physiologischen Bedingungen geschieht dies ohne Destruktion der umliegenden Gewebestruktur [126, 447]. Die Arbeitsgruppe um BOUCHIER- HYES zeigt in einer *in vitro* Studie eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden nach Exposition mit Hämatom- Material von Patienten nach Knochenbruch. Dieser Prozess geht einher mit einer erhöhten Phagozytose und gesteigertem *respiratory burst*, jedoch ohne gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen oder transendothelialer Migration [448]. Auch in dem Versuchsmodell dieser Arbeit kommt es nach Trauma zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge, jedoch ohne eine gesteigerte *reactive oxygen species* (ROS)- Produktion. Es gibt keine Anzeichen einer erhöhten Aktivierung der infiltrierten Granulozyten. In humanmedizinischen klinischen Studien exprimieren neutrophile Granulozyten von Patienten drei Stunden nach Trauma [449] und nach abdominalen Operationen [450] vermehrt CD11b auf ihrer Oberfläche. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit. CD11b dient als Rekrutierungsfaktor zur festeren Bindung zwischen *polymorph nuclear granulocytes* (PMNs) und Endothel während der transendothelialen Migrationsphase. Diese Beobachtungen zeigen dass starke Traumata eine Aktivierung von Granulozyten und eventuell auch Reifung von Granulozyten induzieren. Möglicherweise ist das hier verwendete Trauma nicht stark genug um Veränderungen in der CD11b- Expression von Granulozyten zu induzieren.

In *in vivo* Versuchsmodellen führt die Induktion steriler Traumata zur Infiltration signifikanter Anzahlen an Granulozyten in die Lunge als Ort entfernt des Traumageschehens, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet werden kann. Dieser Prozess geht einher mit der Initiierung einer Inflammation, im ungünstigsten Fall bis hin zur Ausbildung eines ARDS [379, 383, 445, 451, 452]. Ein prädisponierendes Trauma, welches alleine nicht zur Entwicklung eines *acute lung injury* (ALI) führt, wie z.B. Hämorrhagischer Schock, kann eine Vorprägung von neutrophilen Granulozyten

hervorrufen. Dies hat eine moderate Aktivierung sowie eine verzögerte Apoptose der PMNs zur Folge. Nach Induktion eines *second hit*, wie z.B. Sepsis, erhöht sich durch die gesteigerte Gesamtgranulozytenzahl, der Gesamt- *respiratory burst* von Granulozyten. Es kommt zu Schädigungen des umliegenden Lungengewebes und gleichzeitig wird eine Inflammation induziert. [359, 379, 453, 454]. Die darauf folgenden pathologischen Auswirkungen im Lungengewebe sind Schädigungen der endothelialen sowie epithelialen Membranen, welche in einer erhöhten kapillaren Permeabilität resultieren, gefolgt von Lungenödem und einem unkontrollierten Influx an Granulozyten in die Lunge. Die Aktivierung und Transmigration von PMNs steht im Zusammenhang mit Adhärenz, Diapedese, Sequestrierung im Gewebe und Sekretion zytotoxischer Produkte in der Lunge [381, 455, 456]. Diese Prozesse entsprechen der Entwicklungsphase des Komplikationssyndroms ARDS und sind signifikant für die Manifestation eines ARDS [457, 458].

---

#### 6.1.1 ZEITLICH ABHÄNGIGE GRANULOZYTENREKRUTIERUNG IN DIE LUNGE NACH TRAUMA

---

Das in dieser Arbeit angewendete stumpfe Weichteiltrauma auf die Gastrocnemius-Muskulatur beider Hinterbeine von Mäusen führt zu einer signifikanten Infiltration an Granulozyten in die Lunge (s. Abb. 5.3 A + B) und dem Blut (s. Abb. 5.5 A + B) drei und sechs Stunden sowie vier Tage nach Traumatisierung. Der maximale Influx an Granulozyten stellt sich zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma in Lunge und Blut ein. Der Rückgang der Granulozytenanzahl in den Bereich der Kontrollgruppe ist 24 Stunden und sieben Tage nach Trauma zu beobachten. In einer Studie zur Lungeninflammation nach Aspiration von Magensäure von BARLETTA und Mitarbeiter ist der Höhepunkt der PMN- Infiltration in die Lunge und im Blut zu dem Zeitpunkt vier Stunden nach Traumainduktion nachweisbar, gemessen mittels Durchflusszytometrie [459]. Obwohl es sich hierbei um einen direkten Insult der Lunge handelt, sind die Ergebnisse ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit. KOBBE und Mitarbeiter finden eine gesteigerte Granulozytenzahl über die Bestimmung der MPO- Konzentration in der Lungen von Mäusen eine Stunde nach bilateraler Femurfraktur [403]. In einem Verbrennungsmodell an Mäusen findet sich der maximale Influx an neutrophilen Granulozyten in die Lunge sechs Stunden nach

Trauma, ist aber zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Verbrennung nicht mehr sichtbar [445]. Allerdings werden frühere Zeitpunkte in dieser Studie nicht berücksichtigt. Die Infiltration von Granulozyten in die Lunge findet kurz nach einem Trauma statt, wie sich in diesem sowie in anderen Traumamodellen bestätigt. Diese verläuft unabhängig vom Verletzungsmuster und sogar ähnlich wie bei direkter Schädigung der Lunge.

In der histopathologischen Untersuchung von Lungengewebe zu den Zeitpunkten drei Stunden und vier Tage nach Weichteiltrauma (Daten nicht gezeigt) werden in keiner Versuchsgruppe Veränderungen des Lungengewebes oder Gewebeverletzungen festgestellt. Auch MENZEL und Mitarbeiter beschreiben in einem Traumamodell mit bilateraler Fraktur/ Pseudofraktur der Hinterextremitäten bei Mäusen jeweils eine erhöhte Granulozytenanzahl in Lungen- und Lebergewebe. Die Granulozyten infiltrieren die Organe in den Zeiträumen zwei, vier und sechs Stunden nach Traumainduktion ohne offensichtliche histologische Gewebeverletzungen in der Lunge hervorzurufen [402]. Das Weichteiltrauma dieser Arbeit führt, ähnlich wie beim beschriebenen Fraktur/ Pseudofraktur- Modell, zu einer Granulozyteninfiltration in die Lunge im Zeitraum von einer bis 24 Stunden, mit einem maximalen PMN- Anstieg drei Stunden nach Trauma, ohne histopathologische Veränderungen herbeizuführen.

Inflammatorische Prozesse in Trauma [330, 460, 461] oder Sepsis [462, 463] können zu verzögerter Apoptose von neutrophilen Granulozyten führen. Diese Auswirkung kann bis zu drei Wochen nach dem pathologischen Insult anhalten. Die Folge des verminderten Absterbens der Granulozyten, kombiniert mit weiterem Influx von neuen PMNs in das betroffene Gewebe, ist eine exzessive Akkumulation neutrophiler Granulozyten [157, 160]. Es scheint eine Korrelation zwischen der verzögerten Apoptose neutrophiler Granulozyten und einer überschießenden Immunantwort nach Trauma zu geben [150, 464], welche in Organen wie Leber [465], Lunge [381, 466] und Niere [467] zu Organverletzungen führen kann. Das in diesem Versuchmodell durchgeführte Weichteiltrauma induziert offensichtlich keine verlängerte mittlere Überlebenszeit der infiltrierten Granulozyten (in der Regel sechs bis zehn Stunden [159, 160]), da die Anzahl an Granulozyten nur kurzfristig ansteigt und ab dem Zeitpunkt drei Stunden nach Traumainduktion stetig abnimmt. 24 Stunden bzw. sieben Tage nach Trauma befindet sich die Anzahl an gemessenen Granulozyten der Traumagruppe wieder im Bereich der Kontrollgruppe. Dies weist eher auf eine

Rekrutierung der Granulozyten in die Lunge aus der Peripherie und dem Knochenmark hin, was sich auch aus der gesteigerten Anzahl an Granulozyten im Blut der traumatisierten Tiere im Vergleich zu nicht-traumatisierten Mäusen ableitet. Demnach ruft das lokal begrenzte Muskeltrauma der Wadenmuskulatur eine Immunmodulation mit systemischer Auswirkung hervor. Insbesondere wird dieser Effekt durch eine massive Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Lungen traumatisierter Tiere sichtbar. In der Milz wird keine signifikante Granulozyteninfiltration nach Trauma beobachtet (s. Abb. 5.6).

#### 6.1.1.1 UNREIFE GRANULOZYTEN INFILTRIEREN DIE LUNGE NACH TRAUMA

Der gemessene *mean fluorescence intensity* (MFI) für CD11b<sup>+</sup> Granulozyten in der Lunge nach Traumainduktion ist in der Traumagruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 4.4 C + D). Das auf Granulozyten oberflächenständige Molekül CD11b bildet in Kombination mit CD18 ein Heterodimer als Integrin alpha-M beta-2 ( $\alpha_M\beta_2$ ), welches an Adhäsionsvorgängen, u.a. durch Interaktion mit ICAM-1 [468, 469], und Phagozytose und Chemotaxis beteiligt ist [470]. FUJIMOTO und Mitarbeiter [471] beschreiben die Zunahme der CD11b-Expression an der Zelloberfläche in Korrelation mit einem erweiterten Reifestadium von neutrophilen Granulozyten, welcher im Falle dieses Traumamodells nicht vorzuliegen scheint. In Bezug auf die Lunge nach Weichteiltrauma nimmt die Gesamtanzahl an Granulozyten in der Lunge traumatisierter Mäuse im Vergleich zu Kontrolle zu, jedoch mit einem erhöhten Anteil an Granulozyten mit unausgeprägter CD11b-Expression. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der nachfolgende infiltrierende Granulozytenpool nach Traumatisierung der Wadenmuskulatur sich in einem nicht-ausgereiften Stadium befindet. Damit wird die obige Annahme unterstützt, dass unreife Granulozyten aus Knochenmark/ Blut mit wenig CD11b einwandern. Das induzierte Trauma führt somit zu einer Infiltration von Granulozyten in Lunge und Blut, jedoch ohne Überaktivierung der Granulozyten. In einer Arbeit von VAN WESSEM und Mitarbeiter wandern hauptsächlich Granulozyten mit geringer CD11b-Expression in die Lunge von Ratten nach mechanischer Ventilation alleine oder in Kombination mit Hämorrhagischem Schock ein. Im Gegensatz dazu zeigen die

Granulozyten in der Lunge eine erhöhte CD11b-Expression nach mechanischer Ventilation und intravenöser Instillation von Lipopolysaccharid (LPS) [472]. Auch nach Verbrennungen, Trauma durch Explosion oder Lungenkontusion zeigen in die Lunge eingewanderte Granulozyten einen erhöhten Anteil an CD11b-Oberflächenmolekülen [473]. Unterschiedliche Traumaarten aktivieren die Einwanderung von Granulozyten somit in die Lunge mit verschiedenem Maße von CD11b Expression an ihrer Oberfläche, was als Aktivierungsmarker bzw. als Marker für den Reifegrad von PMNs dient.

Das experimentelle Weichteiltrauma führte in naiven wie auch restimulierten Lungenzellen mit *P. aeruginosa* zu keiner veränderten ROS-Produktion im Vergleich der Tiere mit und ohne Trauma (s. Abb. 5.13 A + B). Zumindest in der Kontrollgruppe wäre eine gesteigerte ROS-Produktion neutrophiler Granulozyten als Antwort auf die bakterielle Stimulation mit *P. aeruginosa* zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist die durchflusszytometrische Messmethode von DHR<sup>+</sup>-Zellen *ex vivo* nicht sensitiv genug um ROS zu detektieren. Auch LIEBERMANN beschreibt die FACS-Messung der DHR 123-Umsetzung als nicht sehr sensitiv [474]. Somit kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Granulozyten geringe Mengen ROS produzieren, die aber nicht nachzuweisend sind.

In der Literatur wird eine Korrelation zwischen einer erhöhten CD11b-Expression auf Granulozyten mit einer vermehrten ROS-Produktion beschrieben [475]. Somit könnte die unveränderte ROS-Aktivität der Granulozyten nach Skelettmuskeltrauma auch durch die verminderten Anzahl an CD11b<sup>+</sup>-Granulozyten der Traumagruppe im Vergleich zur Narkosekontrolle in diesem Traumamodell begründet sein. Die fehlende zellschädigende Wirkung der hier fehlenden ROS-Produktion durch PMNs stellt eine Erklärung für das histopathologisch unbeschädigte Lungengewebe dar (keine Abbildung gezeigt). Im Gegensatz zu diesen Befunden rufen Versuchsmodelle zu ARDS mit massiven Traumata signifikante histopathologische Veränderungen in der Lunge hervor [379].

---

### 6.1.2 WEITERE GRANULOZYTENREKRUTIERUNG INFOLGE SEKUNDÄRER *PSEUDOMONAS*- INFEKTION

---

*P. aeruginosa* ist ein typischer Hospitalismuskeim, welcher Infektionen des Urogenitaltraktes, des Respirationstrakt, der Haut (z.B. Superinfektionen nach Verbrennungen) und des Blutes verursacht [476, 477]. Prädisponiert für akute Infektionen sind v.a. Patienten mit einer beeinträchtigten epithelialen Barriere (großflächige Verletzungen, Verbrennungen) und nach Verlust der lokalen Immunabwehr [478]. Auch bei durch künstliche Beatmung erworbenen Pneumonien sind gerade *P. aeruginosa*- Bakterien die Hauptursache von Infektionen [479-481]. Bei Patienten mit intaktem Immunstatus werden *Pseudomonaden* über körpereigene Phagozyten eliminiert, wobei IFN- $\gamma$  die bakterizide Wirkung der Phagozyten fördert [482]. In bakteriellen Geschehen wird IFN- $\gamma$  hauptsächlich von NK- Zellen produziert als Antwort auf einen IL- 12- Stimulus [341]. Die Zytokine IL- 4, IL- 10 und TGF-  $\beta$  haben eine hemmende Wirkung auf die IFN- $\gamma$ - Synthese der NK-Zellen [483]. Experimentelle, respiratorische Infektionen von Versuchstieren mit *Pseudomonaden* führen zur Aktivierung von Granulozyten und einer massiven Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge [425, 476, 484]. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Studien zu Weichteiltraumata in Kombination mit einer sekundären *Pseudomonas*- Infektion wie beim Versuchsmodell dieser Arbeit. In anderen Traumamodellen führt eine bakterielle Infektion als *second hit* zu einer erhöhten Leukozytenzahl in der Lunge der Versuchstiere [425]. In einem Verbrennungsmodell mit sekundärer Exposition mit *Pseudomonas*- Bakterien wird die Leukozyteninfiltration im histologischen Lungenschnitt nachgewiesen [425]. Auch in einem murinen Versuchsmodell kann eine erhöhte Granulozytenzahl nach Lungenkontusion und folgender intratrachealer LPS- Instillation nach 24 Stunden durch eine erhöhte MPO- Aktivität in der Lunge und einer erhöhten PMN- Konzentration in der broncho alveolärer Lavage belegt werden [485].

Die sekundäre i.n.- Infektion der Versuchstiere mit UV- inaktivierten *P. aeruginosa*- Bakterien in dem in dieser Arbeit verwendeten Weichteiltraumamodell hat einen zusätzliche Anstieg der Granulozytenzahl in der Lunge (s. Abb. 5.18 A – C) sowie im Blut (s. Abb. 5.18 D + E) von Tieren mit und ohne Traumatisierung zur Folge. Die

signifikant erhöhte Granulozytenanzahl drei Stunden nach vorausgegangenem Weichteiltrauma bleibt auch noch nach der sechsstündiger Inkubationzeit der i.n.-Infektion in der Lunge erhalten. Ebenfalls noch vier Tage nach Trauma in Kombination mit einer sekundären *Pseudomonas*-Infektion kann dieser Effekt beobachtet werden. Ohne Sekundärinfektion verringert sich der Wert der Granulozyteninfiltration nach Erreichen der Maximalinfiltration drei Stunden nach Trauma wieder bis hin zur Anzahl der nichttraumatisierten, nichtinfizierten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen, dass die für die Infektabwehr wichtige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge intakt ist.

In dieser Arbeit korreliert die Zunahme der Granulozytenanzahl im *in vivo* Infektionsmodell mit UV-inaktivierten *P. aeruginosa*-Bakterien auch mit einer minimalen Steigerung der ROS-Produktion in den Lungen der infizierten Mäuse mit und ohne Traumainduktion (s. Abb. 5.25). Signifikant mehr DHR<sup>+</sup>-Zellen sind in Lungen von traumatisierten Mäusen und *Pseudomonas*-Infektion im Vergleich zu Traumatieren ohne Lungeninfektion zu messen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das verwendete Weichteiltrauma nicht die Granulozytenrekrutierung sowie deren ROS-Produktion nach Sekundärinfektion beeinflusst. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass nach Trauma das Infektionsrisiko erst reduziert und später erhöht ist [334-336]. Die Granulozyteninfiltration nach Weichteiltrauma könnte somit bei einer Infektion eine protektive Wirkung haben. Um die Frage des Infektionsrisikos im Falle dieses Skelettmuskeltraumas herauszufinden, müsste die Infektion mit lebenden *Pseudomonas*-Bakterien durchgeführt werden um die bakterielle Beladung der Lunge zu bestimmen.

## 6.2 EINFLUSS VON MYD88- SOWIE TLR4 AUF DIE GRANULOZYTENREKRUTIERUNG IN DIE LUNGE NACH TRAUMA

---

Es gibt verschiedene Ansätze zur Klärung wie Granulozyten nach traumatischen Geschehen in die Lunge rekrutiert werden. Allerdings hat jede Traumaart eine andere Auswirkung auf die immunologische Antwort. Somit lassen sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien nicht verallgemeinert auf andere Versuchsmodelle übertragen.

Durch Frakturen induzierte Hämatome bewirken den Anstieg verschiedener immunstimulatorischer Zytokine und Chemokine [403, 486-488]. Diese tragen zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten bei, mit einem Potential an lungenschädigender Wirkung in Bezug auf die Entwicklung eines ARDS. Im Vergleich zu Skelettmuskeltraumata führen Frakturen zu einer erhöhten Blutung, außerdem können Komponenten aus dem Knochen sowie des Knochenmarks freigesetzt werden. Aus der Veröffentlichung von HAUSER und Mitarbeitern ist bekannt, dass es nach Femurfraktur zur Freisetzung von *mitochondrial damage associated molecular patterns* (MTD) in das lokale Wundgewebe und die Zirkulation kommt [489]. Injiziert in naive Ratten führen diese MTDs zu erhöhten Entzündungsparametern mit einer Beteiligung von aktivierten PMNs in der Lunge [490]. In dieser Studie sowie in Studien mit humanen Hepatozyten [491], über Schock [492] und mit Traumapatienten [306] wird ein aktivierender und chemotaktischer Effekt von MTDs auf Granulozyten, fungierend als *damage associated molecular patterns* (DAMPs), beschrieben. DAMPs, als Liganden zellulärer *toll like receptors* (TLRs) u.a. an der Oberfläche neutrophiler Granulozyten [493, 494], warnen den Wirtsorganismus vor Gewebeschäden. Sie mediieren eine immunologische Reaktion, welche auch zu Schädigung von Gewebe führen kann [27, 303]. Vermutlich sind MTDs an der Entstehung traumassoziierter veränderter Lungenhomöostase bis hin zur Entwicklung eines ARDS beteiligt. Auch in diesem Skelettmuskel-Traumamodell könnten MDTs möglicherweise für die Aktivierung von Granulozyten verantwortlich sein und die Granulozyteninfiltration in die Lunge fördern.

Neutrophile Granulozyten exprimieren auf Ebene von mRNA alle TLRs, bis auf TLR3 [495]. Gerade TLR2 und 4 vermitteln die Aktivierung neutrophiler Granulozyten [493, 494], teilweise auch in Abhängigkeit von intrazellulärer Kommunikation mit Monozyten [496]. Der Signalweg von TLR2 sowie TLR4 führt traditionell MyD88-abhängig über *TIR-domain-containing adapter protein* (TIRAP)/ *myeloid adaptor-like protein* (MAL) und bei TLR4 zusätzlich MyD88-unabhängig über *TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$*  (TRIF)/ *TRIF-related adaptor molecules* (TRAM). TLR4 vermittelt die verlängerte Lebensspanne, bzw. *delayed Apoptose* neutrophiler Granulozyten [497]. Generell ist TLR4 an einer systemischen Entzündungsantwort nach Induktion eines sterilen Traumas wie dem Komplikationssyndrom ARDS

beteiligt [427, 498, 499]. Im Gegensatz zu Wildtyp (WT)- Mäusen kann in den Lungen von TLR4<sup>-/-</sup>- Mäuse nach Fraktur/ Muskelgewebsschaden [444] oder Verbrennung [436] eine verminderte MPO- Aktivität als Maß für die Granulozytenanzahl gemessen werden, verglichen mit WT- Mäusen. In dem hiesigen Versuchsmodell des stumpfen Weichteiltraumas auf den *M. gastrocnemius* beider Hinterläufe der Maus kommt es nicht, wie oben beschildert, zu einer verminderten Inflammation in den Lungen traumatisierter TLR4<sup>-/-</sup>- Mäuse. Der Anstieg an Granulozyten in den Lungen nach Muskeltrauma in TLR4<sup>-/-</sup>- Mäusen ist fast gleich dem von WT- Mäusen. Die Granulozytenzahlen in traumatisierten Mäusen mit TLR2,4<sup>-/-</sup> ist dagegen tendenziell rückläufig (s. Abb. 5.11). Aufgrund der insgesamt sehr geringen Datenmenge müssen diese Ergebnisse vorsichtig bewertet werden.

Der Effekt der verminderten Inflammation wird auch intestinal nach Ischämie/ Reperfusion [500] und in der Leber nach Fraktur [501] in traumatisierten TLR4<sup>-/-</sup>- Mäusen beschrieben jeweils verglichen mit WT- Mäusen. Dies führt zu dem Schluss, dass TLR4 nach Fraktur oder Verbrennung an der Granulozyteninfiltration in die Lunge beteiligt ist, wobei PMNs potenziell gewebs- bzw. organschädigender Wirkung haben. Für TLR2 allerdings kann keine Korrelation mit der Einwanderung von Granulozyten in die Lunge festgestellt werden [436]. In den Zytokinanalysen der TLR4<sup>-/-</sup>- Traumagruppe sind die Konzentrationen an IL- 6, IL- 10 sowie TNF-  $\alpha$  im Vergleich zu WT- Mäusen, als Maß für systemische Entzündung, deutlich reduziert [436, 444, 501]. In Studien mit cerebraler Ischämie werden Effekte verminderter Schädigung im Gehirn in Zusammenhang mit TLR4- Defizienz [502, 503] aber auch TLR2- Defizienz [504, 505] nach Traumainduktion im Vergleich zu WT- Mäusen beschrieben. Dies wiederum hebt die unterschiedliche immunologische Antwort auf Traumata verschiedener Ätiologie hervor.

Es lässt sich hiernach die Vermutung aufstellen, dass die Immunantwort auf ein stumpfes Weichteiltrauma in diesem Fall nicht über TRIF sondern eher über TIRAP vermittelt wird. Somit könnte die Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Weichteiltrauma bei TLR4<sup>-/-</sup>- Mäuse möglicherweise durch TLR2 mittels des MyD88- abhängigen Signalweg über TIRAP kompensiert werden. Eine Studie von SABROE und Mitarbeiter zeigt, dass mehr TLR2 als TLR4 an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden [496]. Dies unterstützt die Theorie der TLR4<sup>-/-</sup>- Kompensation durch TLR2. Auf neutrophilen Granulozyten werden TLR2 wie TLR4 3

bis 3.5 Stunden nach experimenteller LPS- Exposition zur immunologischen Antwort hochreguliert [506, 507]. In diesem Traumamodell wäre eine TLR2- Aktivierung über freigesetzte DAMPs/ MDTs nach Gewebeerletzung in Korrelation mit der maximalen Granulozyteneinwanderung in die Lunge drei Stunden nach Traumainduktion möglich. Auch ist bekannt, dass der TLR2- Signalweg, nicht aber TLR4, über proinflammatorische Zytokine aktiviert werden kann [508], was jedoch in dieser Arbeit nicht weitergehend analysiert wurde. Es ist notwendig, weitere Versuchsansätze zur Quantifizierung der Daten mit TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2,4<sup>-/-</sup>-Mäusen durchzuführen.

Das zytoplasmatische Adapterprotein MyD88 nimmt eine zentrale Stellung in Verbindung mit der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren MAPK und NFκB ein, da es von allen TLRs außer TLR3 zur Signaltransduktion in der Kommunikationskaskade genutzt wird (s. Kapitel 2.3) [27, 509-511]. Jedoch kommt es in MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen nach Verletzung der Gastrocnemius- Muskulatur nur geringgradig zu einer verminderten Infiltration von Granulozyten in die Lunge im Vergleich zu Wildtypmäusen der Traumagruppe (s. Abb. 5.11 und Abb. 5.12). Auch in einer Traumastudie an Mäusen von VICTONI und Mitarbeiter ist die über MPO- Aktivität ermittelte Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Traumainduktion der Traumagruppe höher als die der Kontrolltiere, jedoch von traumatisierten MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen niedriger als von traumatisierten WT- Mäusen. Auffällig ist die generell niedrigere Granulozytenzahl in den Lungen von MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen verglichen zu den Daten der WT- Kontrolltiere. Dieser Effekt ist beispielsweise auch in den Daten von VICTONI *et al.* (Fig.1) [511] sichtbar, wird allerdings dort nicht diskutiert. Woher diese erniedrigte Anzahl an Granulozyten in der Lunge von MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen kommt, bleibt unbekannt.

Das in dieser Arbeit verwendete induzierte stumpfe Weichteiltrauma der *Gastrocnemius*- Muskulatur führt zu einer MyD88- sowie TLR4- unabhängigen Granulozyten- Rekrutierung in die Lunge von Mäusen mit möglicher Beteiligung von TLR2. Die Arbeitsgruppe um HENNEKE beschreibt einen TLR2- MAL- medierten, MyD88- unabhängigen Signaltransduktionsweg in Zusammenhang mit LPS- Stimulation in Phagozyten [512]. In Bezug auf Granulozyten und Weichteiltrauma gibt es hierzu derzeit keine direkten Daten, welches aber die mögliche Beteiligung dieses Weges, oder auch anderer, an der Granulozytenrekrutierung nach Trauma nicht ausschließen lässt. Der Hinweis zeigt den Bedarf weiterer Forschungsarbeit auf.

### 6.3 TRAUMATISCH BEDINGTE VERÄNDERUNGEN AUF MOLEKULARER UND ZELLULÄRER EBENE

---

#### 6.3.1 SERUM ALS KOMMUNIKATIONSMEDIUM ZUR GRANULOZYTENREKRUTIERUNG NACH TRAUMA

---

Zur Klärung der Fragestellung, ob lösliche Mediatoren an der Granulozyteninfiltration nach Weichteiltrauma beteiligt sein können, wird ein Versuchsaufbau mit Serumtransfer gewählt. Hierbei wird Serum von traumatisierten Mäusen drei Stunden nach Traumainduktion entnommen sowie von Mäusen der Narkosekontrolle und i.v. in die Schwanzvene naiver Tiere injiziert (s. Abb. 5.15). Der Serumtransfer von traumatisierten Mäusen in naive Mäuse führt zu einer erhöhten Granulozytenanzahl in den Lungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 5.16). Dies lässt darauf schließen, dass eine Modulation der Homöostase löslicher Botenstoffe an der Immunantwort auf ein Weichteiltrauma in der Lunge beteiligt ist. Auch in Bezug auf Lymphe als Kommunikationsmedium ist bekannt, dass die Ligation des mesenterialen Lymphductes eine entzündliche Ausprägung in der Lunge nach Trauma (Laparotomie) in Kombination mit Hämorrhagischem Schock verhindert [513, 514]. Nach Transfer von Lymphe traumatisierter Mäuse in naive Mäuse wird wieder eine inflammatorische Immunantwort in der Lunge hervorgerufen [515]. Arbeitsgruppenintern ist bekannt, dass nach stumpfen Skelettmuskeltrauma des *M. gastrocnemius* wie in dieser Arbeit verwendet der Lymphfluss im traumatisierten Muskel zum drainierenden Lymphknoten nicht gestört ist. Daher könnten Mediatoren, die aus dem verletzten Skelettmuskel freigesetzt werden, über die Lymphbahnen in das Blut und weiter in die Lunge gelangen.

Die Identität des löslichen Mediators im Serum kann in dieser Studie jedoch nicht geklärt werden. Auffällig ist, dass drei Stunden nach Trauma der Wert des Serumproteins S100A8/A9 erhöht ist. Im Serum befinden sich u.a. S100- Proteine, welche zur Kommunikation im Organismus beitragen. Die Kalzium- bindenden Proteine S100A8/ S100A9 werden im Zytosol von neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen und Monozyten exprimiert. Hohe Mengen an S100A8/ S100A9 finden sich extrazellulär in infizierten oder entzündeten Geweben und sind an der Rekrutierungskaskade von Leukozyten beteiligt [516, 517]. Murines S100A8 gilt als potenter chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten. *In vitro* Studien

ergeben, dass neutrophile Granulozyten vermindert auf chemotaktische Stimuli ansprechen, wenn kein S100A9 vorhanden ist und in einem *in vivo*- Versuchsmodell mit S100A9<sup>-/-</sup>- Mäusen wird eine verminderten Granulozyten- Rekrutierung während der Wundheilung registriert [316, 518]. Diese Kalzium- bindenden Proteine werden als DAMPs über TLRs während infektiösen und entzündlichen Prozessen erkannt und sind an der immunologischen Antwort durch Förderung der Granulozyteneinwanderung in inflammatorische Gewebe beteiligt [316, 517]. Parallel zur maximalen Granulozyteninfiltration in die Lunge traumatisierter Mäuse drei Stunden nach induziertem Skelettmuskeltrauma steigt die Konzentration an S100A8/ S100A9- Proteinen im Serum dieser Mäuse signifikant an (s. Abb. 5.14). Eine Stunde nach Trauma sind die gemessenen Werte von Trauma- und Kontrollgruppe gleichwertig. Nach Anstieg der S100A8/ S100A9- Konzentration zu dem Zeitpunkt der Maximalkonzentration, verringern sich die erhöhten Konzentrationswerte in den Serumproben von Mäusen nach Muskeltrauma auf nahezu den Ausgangswert, nur minimal erhöht im Vergleich zu Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sprechen für eine Korrelation zwischen der Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Weichteiltrauma und der erhöhten Konzentration an S100A8/ S100A9. Eine Aussage über den Zusammenhang kann jedoch nicht getroffen werden. Weitere Studien werden benötigt um genauere Ergebnisse zu erzielen. Ein Ansatz wäre die Versuchsdurchführung mit S100<sup>-/-</sup>- Mäusen durchzuführen oder spezifisch die einzelnen S100- Proteine durch Antikörper zu blockieren.

---

### 6.3.2 IL- 6, KC UND MIP- 2: BETEILIGUNG AN LUNGENINFLAMMATION NACH WEICHTEILTRAUMA

---

Zytokine und Chemokine als lösliche Mediatoren der Immunantwort werden je nach Traumamodell und in Abhängigkeit zur Zeit in unterschiedlichen Mustern freigesetzt. Dieses erschwert die Erfassung der verschiedenen Zytokinkonzentrationen nach Trauma. Frakturen führen zu erhöhten Serumkonzentrationen an IL- 6, IL- 2, IL- 10, und TNF-  $\alpha$  [403, 427, 486]. Komplette Zerstörung der Oberschenkelmuskulatur von Mäusen hat eine Erhöhung der Chemokine KC und MIP- 2 im Serum zur Folge, was hingegen nach einer Fraktur nicht zu beobachten ist [403].

In den meisten Untersuchungen zu Trauma werden Serumproben auf Zytokinmuster untersucht. Jedoch können SCHMITZ und Mitarbeiter in Bezug auf ein Weichteiltrauma, vergleichbar mit dem in dieser Arbeit genutzten Versuchsmodell, keine veränderten Zytokinkonzentrationen im Serum traumatisierter Mäuse feststellen. Wahrscheinlich ist der Schweregrad von diesem Weichteiltrauma nicht hoch genug um eine Auswirkung auf die Chemo- sowie Zytokinkonzentrationen im Serum zu haben.

Das *Keratinocyte derived chemokine* (KC/ CXCL- 1) und das *Macrophage inflammatory protein- 2* (MIP- 2/ CXCL- 2) sind Homologe des humanen IL- 8 und wirken stark chemotaktisch auf Granulozyten [519-522]. Auch die Akkumulation von Granulozyten in Geweben wie der Lunge werden durch KC und MIP- 2 gefördert [523]. Sie sind wichtige Mediatoren bei der Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und wirken über die Chemokin- Rezeptoren (CXCR)- 1 + 2 , als Hauptchemokinrezeptoren für neutrophile Granulozyten [524-527]. Während akuter Entzündungsprozesse fungiert KC als ein potentes und systemisch wirksames Chemokin, wohingegen die MIP- 2- Expression eher limitiert auf das lokale Inflammationsgeschehen stattfindet [528]. Die Hauptquelle für die Sekretion von MIP- 2 sind Monozyten und Makrophagen und für KC Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Epithelzellen [529]. Auch in experimentellen Inflammationen der Lunge durch Lungenkontusion, Hämorrhagischer Schock, Fraktur oder Immunglobulin- medierter Entzündung sind die gemessenen Werte an KC und MIP- 2 im Serum der Versuchstiere erhöht. In den Versuchsmodellen ist die Freisetzung der Chemokine mit einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge assoziiert [359]. Dies ist vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten Weichteiltraumamodell. Drei Stunden nach Skelettmuskeltrauma und Restimulation sind die Werte an KC und MIP- 2 in der Lungenkultur von Mäusen tendenziell erhöht (s. Abb. 5.23 A + B) wie auch die Anzahl der Granulozyten in der Lunge. LOMAS- NEIRA und Mitarbeiter zeigen dass MIP- 2 im Hämorrhagischen Schock mehr an der Rekrutierung von Granulozyten beteiligt ist als KC. Die eigentliche chemotaktische Wirkung von MIP-2 und KC auf Granulozyten oder das Ausmaß der Wirkung auf die Infiltration von Granulozyten in die Lunge werde in diesem Skelettmuskel- Traumamodell nicht untersucht. Dazu müssten beispielsweise Untersuchungen mit

Antikörpern gegen MIP- 2 und KC oder der Inhibierung des Rezeptor (CXCR2) für MIP- 2 und KC durchgeführt werden.

IL- 6 besitzt als typisches proinflammatorisches Zytokin großen Einfluss auf Granulozyten im Entzündungsgeschehen durch Aktivierung, Rekrutierung und Beeinflussung der Apoptose neutrophiler Granulozyten [530]. Die erhöhte Sekretion von IL- 6 wird konstitutiv im Zusammenhang mit inflammatorischen Insulten wie Trauma und Sepsis nachgewiesen [477, 531-533] und auch als Marker für die Schweregradbestimmung eines Traumas genutzt [534, 535]. IL- 6 vermittelt den Übergang der frühen prädominanten granulozytären Immunantwort im entzündlichen Gewebe in einen nachfolgenden Influx mononukleärer Zellen und CD3<sup>+</sup>- T- Zellen. Diese prädominanten granulozytären Phase ist geprägt durch Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe [536-539]. In diesem Versuchsmodell führt die Induktion des Weichteiltraumas auf die Wadenmuskulatur von Mäusen zu keiner veränderten IL- 6- Sekretion in der Lungenkultur drei Stunden nach Trauma (s. Abb. 5.24 A). Vermutlich befindet sich die Inflammation zeitliche in der prädominanten granulozytären Phase mit einer massiven Granulozyteninfiltration in die Lunge, aber unveränderter IL- 6- Konzentration. Diese These wird unterstützt durch die erhöhten Konzentrationen an KC und MIP- 2 in den Lungen von traumatisierten Mäusen. In einem experimentellen Frakturmodell von KOBBE und Mitarbeiter kommt es erst fünf Stunden nach Traumainduktion zu einer Erhöhung von KC und IL- 6 im Serum traumatisierter Mäuse [443]. In dem hier angewendeten Traumamodell würde dieser Zeitpunkt mit dem langsamen Abfall der Granulozytenanzahl korrelieren, gemessen ab dem Zeitpunkt sechs Stunden nach Trauma (s. Abb. 5.3 A + B), und somit die Einleitung der postgranulozytären Phase beschreiben.

Eine Stunde nach Traumainduktion infiltrieren Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> Monozyten (s. Abb. 5.7 A) und CD3<sup>+</sup>- T- Zellen (s. Abb. 5.8 B) in die Lungen traumatisierter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anstieg dieser Zellpopulationen wäre laut Literatur eher zu einem Zeitpunkt mit rückläufiger Granulozytenanzahl später als sechs Stunden nach Trauma zu erwarten gewesen [536-539]. Anhand der vorliegenden Daten kann die Ursache der beobachteten Zunahme der Zellzahlen nicht geklärt werden. Die Untersuchung der Monozytenpopulationen in Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> und Ly6C<sup>low</sup> Ly6G<sup>-</sup> zeigt nur geringgradige Unterschiede.

Die durchflusszytometrisch gemessene Alveolarmakrophagen (AM)- Population zeige keine zahlenmäßige Veränderung nach Traumatisierung der *Gastrocnemius*-Muskulatur im Vergleich zur Narkosekontrollgruppe auf (s. Abb. 5.7 C). Typischerweise kommt es nach schwerer Traumatisierung während der Entwicklung eines ARDS zu einer Maximierung der Makrophagenanzahl, Wunddebridement und Regulation weiterer immunologischer Antwortmechanismen. Die Makrophagen phagozytieren apoptotische Granulozyten. Allerdings scheint die Auswirkung des hier angewendeten stumpfen Muskeltraumas nicht so hoch zu sein, als dass es zu einer Aktivierung und Infiltration weiterer Monozyten (hier nur geringgradig) und zur Weiterentwicklung in Gewebsmakrophagen und Dendritische Zellen (DCs) oder direkten Rekrutierung von Makrophagen und DCs führt.

---

### 6.3.3 IL- 10 UND IFN- $\gamma$ KOMPONENTEN DER INFEKTABWEHR NACH WEICHTEILTRAUMA

---

Schwere Verletzungen die intensivmedizinisch behandelt werden müssen, korrelieren oftmals mit einer reduzierten Fähigkeit einer Interferon (IFN)-  $\gamma$ - Bildung [540, 541]. Dies wird in experimentellen Studien mit Hämorrhagischen Schock sowie Fraktur intensiv untersucht, allerdings nicht in Bezug auf Weichteiltrauma [324, 325, 542, 543]. Anwendung von rekombinanten IFN-  $\gamma$  in schwerverletzten Patienten vermindert das Infektionsrisiko [544, 545], was bestätigt wie essentiell IFN-  $\gamma$  in der Immunabwehr ist. IFN-  $\gamma$  wird typischer von T<sub>H</sub>1- Zellen [57] und NK- Zellen [75, 546] sezerniert. In Bezug auf bakterielle Infektionen spielt IFN-  $\gamma$  über die Aktivierung der phagozytischen Immunzellen eine wichtige Rolle, wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben. Hierbei stellen NK- Zellen die Hauptquelle für INF-  $\gamma$  dar. Interessanterweise zeigt die Analyse der IFN-  $\gamma$ - Konzentration in den Lungenkulturen der traumatisierten Mäuse einen signifikanten Abfall drei Stunden nach Trauma mit und ohne Restimulation, im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe (s. Abb. 5.24 B). Mögliche Gründe dafür hätte eine Erniedrigung der Gesamtzellzahl an NK- Zellen in der Lunge nach Trauma oder aber eine geringe Produktion an IFN-  $\gamma$  pro NK- Zelle sein können. Neben der unveränderten Anzahl an T- Zellen und NKT- Zellen (s. Abb. 5.8 A+B) ist auch die Population der NK- Zellen zum Zeitpunkt drei Stunden nach Weichteiltrauma unverändert (s. Abb. 5.8 C). Das lässt die Vermutung zu, dass je NK- Zelle weniger

IFN- $\gamma$  nach Trauma produziert wird als in der Kontrollgruppe mit und ohne Restimulation.

NK- Zellen sind während der physiologischen Lungenhomöostase inaktiviert zum Schutz vor Gewebeschäden, was zu Lungenfunktionsstörungen wie defizientem Gasaustausch führen würden. Erst über Mediatoren aktivierter AMs erlangen respiratorische NK- Zellen ihren Aktivierungszustand zur Verteidigung gegen pathologische Einflüsse [262, 263, 547, 548]. Ebenfalls in einer Sepsis- Studie von HIRSH und Mitarbeiter kann keine verminderte Anzahl an NK- Zellen festgestellt werden, allerdings eine Dysfunktion der NK- Zellen [549]. Gerade in Interaktion mit pulmonalen Epithelzellen produzieren NK- Zellen das für die Immunantwort auf entzündliche und auch mikrobielle Prozesse wichtige IFN-  $\gamma$  [341, 550]. Zur weiteren Analyse in wie weit das induzierte Weichteiltrauma die vitalen Funktionen des Alveolarepithels beeinflusst oder aber zu einer direkten negativen Beeinflussung der NK- Zell- Aktivität führt, müssten gezielte experimentelle Versuchansätze durchgeführt werden. Aber auch IL- 10 hat einen reduzierenden Einfluss auf die Aktivität von NK- Zellen. Es wird im gesunden Organismus beständig von Bronchoalveolar- Epithelialzellen gebildet [551, 552], vermutlich um in der gesunden Lunge überschießende Entzündungsreaktionen auf die dauerhafte Präsentation von harmlosen Partikeln in der eingeatmeten Luft zu verhindern [553]. Jedoch ist auch die Konzentration an IL- 10 in diesem Traumamodell drei Stunden nach Trauma vermindert (beschrieben im unteren Abschnitt) und stellt vermutlich keine Erklärung für die verminderte IFN-  $\gamma$ - Produktion durch NK- Zellen nach Trauma und Restimulation mit *P. aeruginosa* dar. Ursächlich für eine pathologische Immunantwort auf eine *Pseudomonas*- Infektion könnte auch eine Beeinträchtigung der IL- 12 induzierten IFN-  $\gamma$ - Produktion durch NK- Zellen sein [554]. Hauptsächlich wird IL- 12 in Zusammenhang mit einer *Pseudomonas*- Infektion von DCs gebildet [476].

In der Literatur [426] wird in einem murinen Polytraumamodell eine abgeschwächte Entzündungsreaktion mit einhergehender, verminderter Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Leber und Lunge nach Depletion von NK- Zellen beschrieben. Dieses Ergebnis kann in dem hier verwendeten Versuchsaufbau bei einmaliger Durchführung nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Der einmalig durchgeführte Versuch mit depletierten NK-Zellen sollte nur als hinweisend gewertet werden.

DCs sind essentiell für das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort. Sie residieren unter physiologischen Bedingungen in der Lunge zwischen Epithelzellen, Alveolar-Septen und Lungengefäßen [237, 241, 275]. In verschiedenen Lungeninflammationsmodellen wird die Beteiligung von DCs an antiinflammatorischen Effekten zum Schutz der Lunge beschrieben. DCs führen beispielsweise zur Rekrutierung von IL-10-exprimierenden T-Zellen in die Lunge, die einen limitierendem Effekt auf die Granulozyteninfiltration haben oder proinflammatorischer Monozyten in der Lunge inhibieren [397, 555]. Allerdings führen nicht alle traumatischen Insulte zu einer DC-abhängigen inflammatorischen Immunantwort [395], wie auch in dieser Arbeit gefunden. Die Inflammation, ausgelöst durch das Skelettmuskeltrauma, verläuft im Vergleich zu nicht-traumatisierten Mäusen ohne Erhöhung der Anzahl an DCs in der Lunge (s. Abb. 5.7). Die unveränderte Zahl an DCs bedeutet nicht unbedingt, dass die DCs nicht aktiviert wurden. Eine Beteiligung von DCs an einer Immunreaktion auf das Weichteiltrauma durch beispielsweise direkten Zell-Zell-Kontakt wird hierdurch somit nicht ausgeschlossen. In wie weit das induzierte Weichteiltrauma zu einer Dysfunktion der DC führt, ohne deren Anzahl in der Lunge zu vermindern, kann mit diesen Daten nicht weiter geklärt werden. Jedoch könnte eine veränderte Funktion von DCs als Quelle für IL-12 eine Erklärung für die niedrigere IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen nach Weichteiltrauma und Restimulation darstellen. Und wiederum wäre auch ein Einfluss auf die erniedrigte IL-10-Konzentration in der Lungenkultur durch fehlenden Einfluss auf T-Zellen möglich. In weiteren Versuchsreihen müsste dazu die Rolle der DCs an der Immunmodulation eines Weichteiltraumas geklärt werden.

IL-10 ist ein regulatorisches Zytokin, welches von Zellen des angeborenen Immunsystems, Lungenepithel und regulatorischen T-Zellen freigesetzt wird [383]. Der Respirationstrakt wird unter stetiger Exposition mit Partikeln auch apathogener Qualität konfrontiert. Gerade deshalb sezerniert das respiratorische Epithel kontinuierlich IL-10 zur Balance der Entzündungsantwort und zum Schutz vor unlimitierten Inflammationsreaktionen (s. Kapitel 2.2). Die verminderte IL-10-Produktion lässt keine Rückschlüsse auf die zelluläre Quelle zu, da nach *P. aeruginosa*-Stimulation nicht bekannt ist, welche Zellen das IL-10 produzieren. Auf jeden Fall kann ausgeschlossen werden, dass vermehrte Produktion von IL-10 für die verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion verantwortlich ist.

Die in diesem Kapitel diskutierten verschiedenen Aspekte der Immunmodulation in Zusammenhang mit Traumageschehen beinhalten komplexe Kommunikationswege verschiedener Mediatoren und klassische Effektorzellen zu inflammatorischem aber auch zu suppressivem immunologischen Geschehen. Die pathologisch veränderte Homöostase in der Lunge stellt einen prädisponierenden Faktor für die Ausprägung eines ARDS dar, welches als Komplikationssyndrom mit einer deutlich erhöhten Mortalitätsrate einhergeht.

Die potentiell zytotoxische Wirkung dysregulierter neutrophiler Granulozyten in der Lunge kann zu pathologischen Veränderungen des Lungengewebes führen die hier nach Skelettmuskeltrauma beschrieben wurden und könnte eine fatale Dysfunktion der Lunge als lebenswichtiges, oxigenierendes Organ mit sich ziehen.

#### 6.4 RELEVANZ MURINER TRAUMAMODELL FÜR DIE PRÄVENTIONSMEDIZIN

---

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dass auch schon relativ begrenzte Weichteilverletzungen wie ein isoliertes stumpfes Trauma des *M. gastrocnemius* der Maus signifikante Veränderungen der immunologischen Homöostase sogar entfernt des induzierten Skelettmuskeltraumas in der Lunge auslösen. Wenn das Trauma Teil eines multifaktoriellen Geschehens ist, z.B. mit Hypothermie, Hypovolämie, Organverletzungen, dermale Ablationen, Schock, weitergehenden begleitenden Verletzungen oder auch bestehenden Immundefiziten einhergeht, oder wenn weitere Bedrohungen des Immunsystems in Form eines *second hit* durch Infektion dazukommen, besteht die Gefahr eines sich entwickelnden *acute respiratory distress syndrome* (ARDS). Weichteilverletzungen treten bei Unfällen jeglicher Art, aber auch iatrogen bei allen Operationen auf. Gerade in der Kleintiermedizin sind ursächliche Traumageschehen nicht immer zu rekonstruieren. Allein die Vielfalt der vorkommenden Verletzungen z.B. beim Hundesport [556], Unfällen, Bissverletzungen, sowie induziert durch Operationen [557, 558] macht wie in der Humanmedizin die Versorgung veterinärmedizinischer Patienten zu einer Herausforderung. Trotz gezielter Behandlungsmethoden und konsequenter

Versorgung der Patienten drohen dabei zusätzlich noch Komplikationen durch Entgleisungen des Immunsystems wie bei dem ARDS in der Lunge.

Die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Immunreaktion in der Lunge nach Trauma und zur Pathogenese eines ARDS beruhen auf verschiedenen Tiermodellen, die z.B. an Mäusen, Ratten, Schafen, Hunden, Schweinen getestet wurden [278, 388, 490, 559]. Auch bei Hunden ist die Entwicklung einer *acute lung injury* in Bezug auf künstliche Beatmung und Transfusion bekannt, welche in engen Zusammenhang mit der Versorgung von Traumapatienten stehen [560, 561]. Die Ergebnisse der Studien zeigen dass die Immunmodulationen die zur Entwicklung dieses ARDS führen können zwar jeweils ähnlich sind, im Detail aber von geno- wie phänotypischen Faktoren, u.A. Spezies, Geschlecht, Alter, aber auch ursächlich von der Traumaart abhängen [365]. Somit tragen die jeweiligen Untersuchungen der Pathologie in der Lunge zum besseren Verständnis der Entwicklung eines ARDS bei, können aber nicht direkt und quantitativ auf andere Spezies übertragen werden. In der Klein- und Heimtiermedizin sollten dementsprechend zur Bewertung der zu erwartenden Traumakomplikationen bei den verschiedenen Spezies am ehesten die Tiermodelle der verwandten Arten herangezogen werden.

Zum Schutz vor Immunkomplikationen in der Traumatologie wie z.B. Multiorganversagen müssen diese immunmodulatorischen Effekte zur Kenntnis genommen werden, und zum Anlass für ausreichende Analysen des Immunstatus genommen werden. Traumageschehen verschiedener Ätiologien dürfen nicht als gleichwertige Krankheitsbilder angesehen werden und die therapeutischen Maßnahmen müssen individuell, vor allem auch wegen der Kombination differenter Insulte zugeschnitten werden. Dazu gehören neben dem Ausreizen der allgemeingültigen Vorsichtsmaßnahmen z.B. verminderter Gasdruck während der künstlichen Beatmung, Regulation des Flüssigkeitshaushaltes, optimierte Thermoregulation oder aseptische Wundversorgung. Wegen der Immunmodulation nach Weichteiltrauma sind minimalinvasive Methoden im chirurgischen Vorgehen deutlich gegenüber Behandlungen mit weiterem Gewebeschaden zu präferieren. Fortschrittliche Immuntherapeutika zum Schutz der Lunge und zur Verhinderung der Entwicklung eines ARDS bieten Möglichkeiten zur Begrenzung der Dysregulation neutrophiler Granulozyten.

In wie weit ein direkter Eingriff in immunologische Reaktionskaskaden z.B. durch künstliches Surfactant, Beatmungsmethoden oder immunologische Adjuvantien zur Verhinderung einer systemischen Dysregulation in der Klinik einsetzbar sind, muss in weiterer Versuchsprojekten geklärt werden. Die Aspekte Alter, Zyklusstatus, physiologische Verfassung, exponierte Umgebung (z.B. Keimflora, Temperatur, ernährungsphysiologische Versorgungslage) wurden hier nicht weiter diskutiert, dürfen aber auf Grund ihres immunmodulatorischen Effektes nicht außer Acht gelassen werden und sollten in weitere experimentelle Studien einbezogen werden. Zur Erweiterung des Verständnisses der einzelnen Traumata verschiedener Ätiologien und zur Verbesserung der klinischen Patientenversorgung werden weitere Forschungsarbeiten von Nöten sein. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der Modulation des Immunsystems nach Weichteiltrauma bei.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

---

Das Immunsystem, bestehend aus angeborenen und adaptiven Komponenten, stellt eine wichtige Schutzfunktion des Organismus vor Infektionen dar. Traumata unterschiedlicher Genese können eine massive systemische Inflammation induzieren und zu lebensbedrohlichem Multi- Organversagen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem ersten Überblick die Immunmodulation in der Lunge von Mäusen nach stumpfen Skelettmuskeltrauma auf die *Gastrocnemiusmuskulatur* untersucht.

Die signifikante Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge nach stumpfem Trauma der *Gastrocnemiusmuskulatur* verdeutlicht den massiven Einfluss eines traumatischen Insultes auf das Immunsystem. Das Maximum der Granulozyteninfiltration in die Lunge und das Blut von Mäusen des Wildtyps wurde drei Stunden nach Skelettmuskeltrauma erreicht, wobei die Zahl der Granulozyten nach Trauma als normalisierter Wert des Medians der Kontrollgruppe von 100% in der Lunge auf 232,16% und im Blut auf 176,95% anstieg. Auch bei MyD88<sup>-/-</sup>- Mäusen wurde ein Anstieg der Granulozyten im Median in den Lungen der traumatisierten Tiere um das 2,8 fache und im Blut um das 2,5 fache gemessen und bei TLR4<sup>-/-</sup>- Mäusen in der Lunge um das 2,9 fache. Zeitgleich konnte eine signifikante Erhöhung des Medians der Serumkonzentration an S100A8/ S100A9-Kalzium-Proteinen von 427 ng/ml auf 1396,5 ng/pg gemessen werden. Vermehrt unreife Granulozyten mit geringer Expression von CD11b Protein auf der Zelloberfläche wanderten drei Stunden nach Trauma in die Lunge ein, gemessen mit der *mean fluorescence intensity* in der Narkosekontrollgruppe von 6165,25 erniedrigt bei Mäusen nach Skelettmuskeltrauma auf 5634,95, jedoch ohne gleichzeitig ROS Produktion oder histopathologische Veränderungen der Lunge hervorzurufen. Nach sekundärer *Pseudomonas*- Infektion wurde eine Einwanderung neutrophiler Granulozyten pulmonal und hämatologisch sowohl mit als auch ohne Traumainduktion unter Zunahme der ROS- Produktion beobachtet. In der Lunge erhöhte sich die Zahl der Granulozyten drei Stunden nach Trauma und nachfolgender *Pseudomonas*infektion von 100% der Narkosekontrollgruppe ohne *Pseudomonas*infektion auf 700,13% in der infizierten Narkosekontrollgruppe und auf 860,75% nach Traumatisierung, vier Tage nach Trauma und Infektion von *Pseudomonas*- Bakterien ohne Trauma auf 594,23% und nach Weichteiltraumainduktion auf 1001,17%. Auch Transfer von Serum in naive

Tiere von Tieren der Narkosekontrolle und Tieren drei Stunden nach Trauma führte zu einer signifikanten Infiltration von Granulozyten in die Lunge der naiven Tiere von einem normalisierten Wert 100% der Tiere behandelt mit Serum der Narkosekontrolle auf 160,94 % der Mäuse behandelt mit Serum der Traumagruppe. Die Inflammation befand sich drei Stunden nach Trauma in einer prädominanten granulozytären Phase mit einer unveränderten IL-6-Konzentration und Abfall der Konzentrationen von IFN- $\gamma$  von 6517,1 pg/ml in der Narkosekontrollgruppe auf 5066,9 pg/ml in der Traumagruppe und IL-10 von 218,2 pg/ml in der Narkosekontrollgruppe auf 178,6 pg/ml in der Traumagruppe in der Lungenkultur nach Restimulation mit UV-inaktivierten *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien. Diese Phase ist geprägt durch massive Akkumulation neutrophiler Granulozyten, unterstützt durch die erhöhten Werte der auf Granulozyten chemotaktisch wirksamen Chemokine KC und MIP-2. Nach Restimulation der Lungenkultur mit *Pseudomonas*-Bakterien stieg die KC-Konzentration von 9342,33 pg/ml der Narkosekontrollgruppe auf 12152,3 pg/ml der Traumagruppe und die Konzentration von MIP-2 von 1396,5 pg/ml der Narkosekontrollgruppe auf 37721,3 pg/ml der Traumagruppe. Der statistische Anteil der Zellpopulationen an Alveolar Makrophagen, Monozyten, Neutralen Killer-Zellen, Neutralen Killer T-Zellen, T-Zellen und Dendritischen Zellen blieb zum Zeitpunkt drei Stunden nach Trauma dagegen konstant.

Eine Infektion der traumatisierten Tiere mit Pseudomonaden ergab keine gestörte Granulozytenrekrutierung. Das angewendete Skelettmuskel-Trauma führte zu einer Inflammation durch Granulozyteneinstrom, jedoch ohne Organschädigung zu verursachen wie bei schweren Traumata beschrieben. Die Entzündungsreaktion in der Lunge wird durch lösliche Faktoren im Blut vermittelt.

Die Trauma-induzierte Rekrutierung von Granulozyten in die Lunge könnte einen prädisponierenden Faktor für die Entwicklung eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) darstellen, das mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert ist.

## 8 SUMMARY

---

Traumata induce severe systemic inflammation that may cause life-threatening multiorgan failure.

The study addresses the immunological effect in the lung of mice after soft tissue trauma of the *gastrocnemius muscle*. Significant recruitment of granulocytes from periphery or bone marrow into the lung after soft tissue trauma in the *gastrocnemius muscle* of the mice demonstrates the massive systemic influence of traumata. The infiltration rate of neutrophils into lung and blood of wild type animals reached its maximum three hours past trauma induction, whereat the number of granulocytes increased from 100% in the control group to 232% in lung and 177% in blood for the traumatized mice, as given by the normalized merit of the median. Also for MyD88<sup>-/-</sup> mice, the median of the number of granulocytes in the lung increased 2.8 times after trauma and 2.5 times in blood; for TLR4<sup>-/-</sup> mice after trauma the granulocytes increased 2.9 times in the lung. The effect was accompanied by a significant increase of S100A8/ S100A9 concentration in blood serum from 427 ng/ml to 1397 ng/pg. Less mature granulocytes, detectable by their low abundance of CD11b surface protein, also immigrated into the lung as was measured by *mean fluorescence intensity*. Three hours after soft tissue trauma the concentration had increased from 6165 ng/pg in control mice to 5635 ng/pg for the trauma group, without causing ROS production or histopathological changes in the lung. Secondary infection of mice with *P. aeruginosa* after trauma as well as of control mice led to an extended infiltration of neutrophils into lung and blood. In this case, however, the increase of granulocytes was accompanied by measurable ROS production. The number of granulocyte in the lung increased within three hours after trauma and infection with *pseudomonas* bacteria from 100% for the control group without infection to 700% in the control group with infection, and to 861% after trauma and infection. Four days after trauma and infection an increase of 594% was found for the control group and 1001% for the trauma group. Three hours after trauma there was a pre-dominant granulocytary state of inflammation without changes in IL-6 cytokine concentration and a decrease in the concentration of IFN- $\gamma$  from 6517 pg/ml in control group to 5067 pg/ml after trauma and a decrease in the concentration of IL-10 from 218,2 pg/ml in control group to 178,6 pg/ml after trauma in lung culture after

restimulation with UV- inactivated *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Transfer of serum from mice of the

control group and from mice of the trauma group three hours after trauma to naïve mice induced significant infiltration of granulocytes into the lung of the naïve mice. The normalized merit raised from 100% for the control group to 161% in naïve mice after serum transfer from traumatized mice. This state of inflammation is characterized by massive accumulation of neutrophils challenged by increased concentration of chemokines KC and MIP-2. After restimulation with UV-inactivated pseudomonas bacteria, in lung culture the concentration of KC increased from 9342 pg/ml for the control group to 12152 pg/ml after trauma and the concentration of MIP-2 increased from 1396 pg/ml for the control group to 37721 pg/ml after trauma. Three hours after soft tissue damage, the statistical percentage of alveolar macrophages, monocytes, neutral killer cells, neutral killer T- cells, T- cells and dendritic cells did not change in the cell population.

The infection of traumatized mice with pseudomonas did not cause any defective infiltration of granulocytes. There were also no increase in chemokine production or any histopathological defect of the lung. The muscle trauma resulted in inflammation as well as infiltration of granulocytes without causing organ damage, known to occur for severe traumata. The inflammation of the lung is mediated by soluble components in blood.

The trauma- induced recruitment of granulocytes into the lung may predispose the organism to the development of *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) that is associated with enhanced mortality.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2003) The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance, *Int Rev Cytol* 225, 1-32.
2. Janeway, C. A., Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self, *Immunol Today* 13, 11-16.
3. Janeway, C. A. (2008) *Janeway's Immunobiology*, 7 ed., Garland Science, New York.
4. Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity, *Nat Immunol* 5, 971-974.
5. Cooper, M. D., and Alder, M. N. (2006) The evolution of adaptive immune systems, *Cell* 124, 815-822.
6. Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview, *Mol Immunol* 40, 845-859.
7. Muniz, L. R., Knosp, C., and Yeretssian, G. (2012) Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease, *Front Immunol* 3, 310.
8. Ulm, H., Wilmes, M., Shai, Y., and Sahl, H. G. (2012) Antimicrobial host defensins - specific antibiotic activities and innate defense modulation, *Front Immunol* 3, 249.
9. Medzhitov, R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 449, 819-826.
10. Bangert, C., Brunner, P. M., and Stingl, G. (2011) Immune functions of the skin, *Clin Dermatol* 29, 360-376.
11. Turvey, S. E., and Broide, D. H. (2010) Innate immunity, *J Allergy Clin Immunol* 125, 24-32.
12. da Silva, F. M., Massart-Leen, A. M., and Burvenich, C. (1994) Development and maturation of neutrophils, *Vet Q* 16, 220-225.
13. Stuart E. Turvey, and Broide, D. H. (2010) Integrated human immune system, In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125:24-S32 (DOI:10.1016/j.jaci.2009.07.016 (immunitya, Ed.), Journal of Allergy and Clinical Immunology.
14. Walport, M. J. (2001) Complement. First of two parts, *N Engl J Med* 344, 1058-1066.
15. Dunkelberger, J. R., and Song, W. C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses, *Cell Res* 20, 34-50.
16. Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S., and Fishelson, Z. (2004) Cell signals transduced by complement, *Mol Immunol* 41, 583-597.
17. Mannick, J. A., Rodrick, M. L., and Lederer, J. A. (2001) The immunologic response to injury, *Journal of the American College of Surgeons* 193, 237-244.
18. O'Shea, J. J., Ma, A., and Lipsky, P. (2002) Cytokines and autoimmunity, *Nat Rev Immunol* 2, 37-45.
19. Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism, *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.
20. Fernandez, E. J., and Lolis, E. (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469-499.
21. Oppenheim, J. J. (2001) Cytokines: past, present, and future, *Int J Hematol* 74, 3-8.
22. Dinarello, C. A. (2000) Proinflammatory cytokines, *Chest* 118, 503-508.

23. Opal, S. M., and DePalo, V. A. (2000) Anti-inflammatory cytokines, *Chest* 117, 1162-1172.
24. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system, *Science* 327, 291-295.
25. Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
26. Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system, *Science* 296, 298-300.
27. Kawai, T., and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat Immunol* 11, 373-384.
28. Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009) Toll-like receptors and innate immunity, *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621-625.
29. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., and Martin, M. (2011) TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk, *J Dent Res* 90, 417-427.
30. Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., and Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors, *Nature* 420, 329-333.
31. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., and Akira, S. (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature* 420, 324-329.
32. Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J., and Mansell, A. (2009) MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF-kappaB proinflammatory responses, *J Biol Chem* 284, 24192-24203.
33. Takeda, K., and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity, *Int Immunol* 17, 1-14.
34. Montero Vega, M. T., and de Andres Martin, A. (2008) Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity, *Allergol Immunopathol (Madr)* 36, 347-357.
35. Popescu, F. C., Mogosanu, G. D., Busuioc, C. J., Parvanescu, H., Lascar, I., and Mogoanta, L. (2012) Macrophage response in experimental third-degree skin burns treated with allograft. Histological and immunohistochemical study, *Rom J Morphol Embryol* 53, 1027-1036.
36. Nucera, S., Biziato, D., and De Palma, M. (2011) The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration, *Int J Dev Biol* 55, 495-503.
37. Hume, D. A. (2006) The mononuclear phagocyte system, *Curr Opin Immunol* 18, 49-53.
38. Suzuki, E., Williams, S., Sato, S., Gilkeson, G., Watson, D. K., and Zhang, X. K. (2013) The Transcription Factor Fli-1 Regulates Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cell Development in Mice, *Immunology* 139, 318-327.
39. Wake, K. (1980) Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs, *Int Rev Cytol* 66, 303-353.
40. Matsubara, R., Kukita, T., Ichigi, Y., Takigawa, I., Qu, P. F., Funakubo, N., Miyamoto, H., Nonaka, K., and Kukita, A. (2012) Characterization and identification of subpopulations of mononuclear preosteoclasts induced by TNF-alpha in combination with TGF-beta in rats, *PLoS One* 7, e47930.

41. Guth, A. M., Janssen, W. J., Bosio, C. M., Crouch, E. C., Henson, P. M., and Dow, S. W. (2009) Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L936-946.
42. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392, 245-252.
43. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells, *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
44. Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes, *J Exp Med* 191, 435-444.
45. Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C., and Morris, S. C. (1996) Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion, *J Immunol* 157, 1406-1414.
46. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med* 182, 389-400.
47. Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998) Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation, *J Immunol* 161, 2804-2809.
48. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking, *J Exp Med* 180, 1263-1272.
49. Munz, C., Steinman, R. M., and Fujii, S. (2005) Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity, *J Exp Med* 202, 203-207.
50. Lopez, C. B., Moltedo, B., Alexopoulou, L., Bonifaz, L., Flavell, R. A., and Moran, T. M. (2004) TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses, *J Immunol* 173, 6882-6889.
51. Wilson, N. S., El-Sukkari, D., and Villadangos, J. A. (2004) Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis, *Blood* 103, 2187-2195.
52. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells, *Nature* 388, 782-787.
53. Kobayashi, T., Walsh, P. T., Walsh, M. C., Speirs, K. M., Chiffoleau, E., King, C. G., Hancock, W. W., Caamano, J. H., Hunter, C. A., Scott, P., Turka, L. A., and Choi, Y. (2003) TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development, *Immunity* 19, 353-363.
54. Hackstein, H., and Thomson, A. W. (2004) Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs, *Nat Rev Immunol* 4, 24-34.
55. Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation, *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.

56. Janeway, C. A., Jr., and Bottomly, K. (1994) Signals and signs for lymphocyte responses, *Cell* 76, 275-285.
57. Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells, *Annu Rev Immunol* 12, 635-673.
58. Moser, M., and Murphy, K. M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development, *Nat Immunol* 1, 199-205.
59. Soares, H., Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (2007) A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo, *J Exp Med* 204, 1095-1106.
60. Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R. A. (2004) Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells, *Cell* 117, 515-526.
61. Flynn, S., Toellner, K. M., Raykundalia, C., Goodall, M., and Lane, P. (1998) CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blnr-1, *J Exp Med* 188, 297-304.
62. Choi, S., and Schwartz, R. H. (2007) Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models, *Semin Immunol* 19, 140-152.
63. Kapsenberg, M. L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization., *Nature Reviews Immunology* 3, 984-993 (December 2003) |.
64. Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells, *Curr Opin Immunol* 9, 10-16.
65. Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L., and Munz, C. (2004) Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16606-16611.
66. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells, *J Exp Med* 195, 327-333.
67. Orange, J. S., and Biron, C. A. (1996) Characterization of early IL-12, IFN-alpha/beta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection, *J Immunol* 156, 4746-4756.
68. Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., and Munz, C. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells, *J Exp Med* 195, 343-351.
69. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Suzuki, T., Miyagi, T., and Hayashi, N. (2003) Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection, *J Immunol* 171, 5423-5429.
70. Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M. T., and Tahara, H. (1999) Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively, *J Immunol* 163, 583-589.

71. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15, *Immunity* 26, 503-517.
72. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N. M. (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells, *J Exp Med* 195, 335-341.
73. Orange, J. S. (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse, *Nat Rev Immunol* 8, 713-725.
74. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells, *Nat Immunol* 9, 503-510.
75. Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition, *Annu Rev Immunol* 23, 225-274.
76. Lodoen, M. B., and Lanier, L. L. (2006) Natural killer cells as an initial defense against pathogens, *Curr Opin Immunol* 18, 391-398.
77. Zanoni, I., Granucci, F., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2007) Self-tolerance, dendritic cell (DC)-mediated activation and tissue distribution of natural killer (NK) cells, *Immunol Lett* 110, 6-17.
78. Raulet, D. H., and Vance, R. E. (2006) Self-tolerance of natural killer cells, *Nat Rev Immunol* 6, 520-531.
79. Raulet, D. H. (2006) Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells, *Semin Immunol* 18, 145-150.
80. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., and Hayakawa, Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity, *Mol Immunol* 42, 501-510.
81. Trinchieri, G. (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis, *Semin Immunol* 7, 83-88.
82. Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E., and Zitvogel, L. (2005) Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses, *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, 49-59.
83. Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming, *Nat Immunol* 5, 1260-1265.
84. Yokoyama, W. M., Kim, S., and French, A. R. (2004) The dynamic life of natural killer cells, *Annu Rev Immunol* 22, 405-429.
85. Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L., and Flavell, R. A. (2005) Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma, *Nat Immunol* 6, 600-607.
86. Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G., and Munz, C. (2006) NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion, *Eur J Immunol* 36, 2394-2400.
87. Lunemann, A., Lunemann, J. D., and Munz, C. (2009) Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity, *Mol Med* 15, 352-358.
88. Huntington, N. D., Vosshenrich, C. A., and Di Santo, J. P. (2007) Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans, *Nat Rev Immunol* 7, 703-714.
89. Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S., Svensson, M., Stager, S., and Kaye, P. M. (2008) Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function, *Immunity* 29, 295-305.

90. Grant, L. R., Yao, Z. J., Hedrich, C. M., Wang, F., Moorthy, A., Wilson, K., Ranatunga, D., and Bream, J. H. (2008) Stat4-dependent, T-bet-independent regulation of IL-10 in NK cells, *Genes Immun* 9, 316-327.
91. Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., Kedar, E., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2004) The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46, *Blood* 103, 664-672.
92. Sun, J. C., Beilke, J. N., and Lanier, L. L. (2009) Adaptive immune features of natural killer cells, *Nature* 457, 557-561.
93. O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., and von Andrian, U. H. (2006) T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells, *Nat Immunol* 7, 507-516.
94. Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., Yang, L., Carrero, J. A., and Yokoyama, W. M. (2009) Cytokine-induced memory-like natural killer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1915-1919.
95. Tato, C. M., Martins, G. A., High, F. A., DiCioccio, C. B., Reiner, S. L., and Hunter, C. A. (2004) Cutting Edge: Innate production of IFN-gamma by NK cells is independent of epigenetic modification of the IFN-gamma promoter, *J Immunol* 173, 1514-1517.
96. Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells, *Adv Immunol* 47, 187-376.
97. Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1, In *Nat Rev Immunol* 2011/02/26 ed., 176-186.
98. Ishizaka, T., Conrad, D. H., Schulman, E. S., Sterk, A. R., Ko, C. G., and Ishizaka, K. (1984) IgE-mediated triggering signals for mediator release from human mast cells and basophils, *Fed Proc* 43, 2840-2845.
99. Ishizaka, T., and Ishizaka, K. (1984) Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors, *Prog Allergy* 34, 188-235.
100. Moqbel, R., Macdonald, A. J., Cromwell, O., and Kay, A. B. (1990) Release of leukotriene C4 (LTC4) from human eosinophils following adherence to IgE- and IgG-coated schistosomula of *Schistosoma mansoni*, *Immunology* 69, 435-442.
101. Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H., and Yoshimura, T. (2001) Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses, *J Leukoc Biol* 69, 698-704.
102. Rainer, T. H. (2002) L-selectin in health and disease, *Resuscitation* 52, 127-141.
103. Bullard, D. C., Qin, L., Lorenzo, I., Quinlin, W. M., Doyle, N. A., Bosse, R., Vestweber, D., Doerschuk, C. M., and Beaudet, A. L. (1995) P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli, *J Clin Invest* 95, 1782-1788.
104. Liu, G., Place, A. T., Chen, Z., Brovkovich, V. M., Vogel, S. M., Muller, W. A., Skidgel, R. A., Malik, A. B., and Minshall, R. D. (2012) ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration, *Blood* 120, 1942-1952.
105. Doerschuk, C. M. (2000) Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages, *Respir Res* 1, 136-140.

106. Parkos, C. A. (1997) Molecular events in neutrophil transepithelial migration, *Bioessays* 19, 865-873.
107. Vaporciyan, A. A., DeLisser, H. M., Yan, H. C., Mendiguren, II, Thom, S. R., Jones, M. L., Ward, P. A., and Albelda, S. M. (1993) Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo, *Science* 262, 1580-1582.
108. Delisser, H. M., Baldwin, H. S., and Albelda, S. M. (1997) Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31): A Multifunctional Vascular Cell Adhesion Molecule, *Trends Cardiovasc Med* 7, 203-210.
109. Bokoch, G. M. (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation, *Blood* 86, 1649-1660.
110. Yuan, S. Y., Shen, Q., Rigor, R. R., and Wu, M. H. (2012) Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function, *Microvasc Res* 83, 82-88.
111. Hernandez, L. A., Grisham, M. B., Twohig, B., Arfors, K. E., Harlan, J. M., and Granger, D. N. (1987) Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury, *Am J Physiol* 253, 699-703.
112. McDonald, B., and Kubes, P. (2011) Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation, *J Mol Med (Berl)* 89, 1079-1088.
113. McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C., Beck, P. L., Muruve, D. A., and Kubes, P. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation, *Science* 330, 362-366.
114. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 124, 783-801.
115. Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., and McKercher, S. R. (2003) Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells, *Curr Biol* 13, 1122-1128.
116. Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons, *Trends Immunol* 30, 513-521.
117. Ermert, D., Zychlinsky, A., and Urban, C. (2009) Fungal and bacterial killing by neutrophils, *Methods Mol Biol* 470, 293-312.
118. Weiss, S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils, *N Engl J Med* 320, 365-376.
119. Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Amezaga, M. A., and Rossi, F. (1991) Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components, *Biochem Soc Trans* 19, 63-67.
120. Babior, B. M., Lambeth, J. D., and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase, *Arch Biochem Biophys* 397, 342-344.
121. Robinson, J. M., Ohira, T., and Badwey, J. A. (2004) Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy, *Histochem Cell Biol* 122, 293-304.
122. Robinson, J. M. (2008) Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes, *Histochem Cell Biol* 130, 281-297.
123. Robinson, J. M. (2009) Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species, *Histochem Cell Biol* 131, 465-469.
124. Roos, D., van Bruggen, R., and Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils, *Microbes Infect* 5, 1307-1315.

125. Hietbrink, F., Koenderman, L., Rijkers, G., and Leenen, L. (2006) Trauma: the role of the innate immune system, *World J Emerg Surg* 1, 15.
126. Anderson, B. O., Brown, J. M., and Harken, A. H. (1991) Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury, *J Surg Res* 51, 170-179.
127. Berton, G., and Cassatella, M. A. (1992) Modulation of neutrophil functions by gamma-interferon, *Immunol Ser* 57, 437-456.
128. Ellis, T. N., and Beaman, B. L. (2004) Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function, *Immunology* 112, 2-12.
129. Tansho, S., Abe, S., and Yamaguchi, H. (1994) Inhibition of *Candida albicans* growth by murine peritoneal neutrophils and augmentation of the inhibitory activity by bacterial lipopolysaccharide and cytokines, *Microbiol Immunol* 38, 379-383.
130. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303, 1532-1535.
131. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., and Kubes, P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat Med* 13, 463-469.
132. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J Cell Biol* 176, 231-241.
133. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms, *Cell Microbiol* 8, 668-676.
134. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009) Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis, *Blood* 114, 2619-2622.
135. Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., and Freedman, J. (2011) Platelets and the immune continuum, In *Nat Rev Immunol* 2011/03/26 ed., 264-274.
136. Cassatella, M. A. (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound, *Adv Immunol* 73, 369-509.
137. Brach, M. A., deVos, S., Gruss, H. J., and Herrmann, F. (1992) Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death, *Blood* 80, 2920-2924.
138. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., and Mantovani, A. (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products, *Blood* 80, 2012-2020.
139. Larrick, J. W., Graham, D., Toy, K., Lin, L. S., Senyk, G., and Fendly, B. M. (1987) Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes, *Blood* 69, 640-644.
140. Ming, W. J., Bersani, L., and Mantovani, A. (1987) Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes, *J Immunol* 138, 1469-1474.
141. Green, D. M., Trial, J., and Birdsall, H. H. (1998) TNF-alpha released by comigrating monocytes promotes transendothelial migration of activated lymphocytes, *J Immunol* 161, 2481-2489.

142. Tessier, P. A., Naccache, P. H., Clark-Lewis, I., Gladue, R. P., Neote, K. S., and McColl, S. R. (1997) Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha, *J Immunol* 159, 3595-3602.
143. Ahmed, N. A., Yee, J., Giannias, B., Kapadia, B., and Christou, N. V. (1996) Expression of human neutrophil L-selectin during the systemic inflammatory response syndrome is partly mediated by tumor factor alpha, *Arch Surg* 131, 31-35; discussion 35-36.
144. Perussia, B., Kobayashi, M., Rossi, M. E., Anegón, I., and Trinchieri, G. (1987) Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effect of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *J Immunol* 138, 765-774.
145. Meda, L., Gasperini, S., Ceska, M., and Cassatella, M. A. (1994) Modulation of proinflammatory cytokine release from human polymorphonuclear leukocytes by gamma interferon, *Cell Immunol* 157, 448-461.
146. Zhang, X. W., Liu, Q., Wang, Y., and Thorlacius, H. (2001) CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo, *Br J Pharmacol* 133, 413-421.
147. Zlotnik, A., Morales, J., and Hedrick, J. A. (1999) Recent advances in chemokines and chemokine receptors, *Crit Rev Immunol* 19, 1-47.
148. Savill, J. S., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989) Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism, *J Clin Invest* 84, 1518-1527.
149. Savill, J. S., Wyllie, A. H., Henson, J. E., Walport, M. J., Henson, P. M., and Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages, *J Clin Invest* 83, 865-875.
150. Haslett, C., Savill, J. S., Whyte, M. K., Stern, M., Dransfield, I., and Meagher, L. C. (1994) Granulocyte apoptosis and the control of inflammation, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345, 327-333.
151. Esmann, L., Idel, C., Sarkar, A., Hellberg, L., Behnen, M., Moller, S., van Zandbergen, G., Klinger, M., Kohl, J., Bussmeyer, U., Solbach, W., and Laskay, T. (2010) Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells, *J Immunol* 184, 391-400.
152. Galati, G., Rovere, P., Citterio, G., Bondanza, A., Scagliette, U., Bucci, E., Heltai, S., Fascio, U., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (2000) In vivo administration of GM-CSF promotes the clearance of apoptotic cells: effects on monocytes and polymorphonuclear leukocytes, *J Leukoc Biol* 67, 174-182.
153. Rydell-Tormanen, K., Uller, L., and Erjefalt, J. S. (2006) Neutrophil cannibalism--a back up when the macrophage clearance system is insufficient, *Respir Res* 7, 143.
154. Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities, *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.
155. Nauseef, W. M. (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol Rev* 219, 88-102.
156. Luo, H. R., and Loison, F. (2008) Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation, *Am J Hematol* 83, 288-295.
157. Simon, H. U. (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation, *Immunol Rev* 193, 101-110.

158. El Kebir, D., and Filep, J. G. (2010) Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation, *ScientificWorldJournal* 10, 1731-1748.
159. Egger, G., Spendel, S., and Porta, S. (1988) Characteristics of ingress and life span of neutrophils at a site of acute inflammation, determined with the Sephadex model in rats, *Exp Pathol* 35, 209-218.
160. Paunel-Gorgulu, A., Kirichevska, T., Logters, T., Windolf, J., and Flohe, S. (2012) Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis, *Mol Med* 18, 325-335.
161. Lee, A., Whyte, M. K., and Haslett, C. (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators, *J Leukoc Biol* 54, 283-288.
162. Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W., and Meyer-Bahlburg, A. (2012) Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors, *Nat Rev Immunol* 12, 282-294.
163. Kato, T., Kokuho, T., Tamura, T., and Nariuchi, H. (1994) Mechanisms of T cell contact-dependent B cell activation, *J Immunol* 152, 2130-2138.
164. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., and Aruffo, A. (1992) A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6550-6554.
165. Borghesi, L., and Milcarek, C. (2006) From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion, *Immunol Res* 36, 27-32.
166. Ollila, J., and Vihinen, M. (2005) B cells, *Int J Biochem Cell Biol* 37, 518-523.
167. Lutz, H. U. (2012) How immune complexes from certain IgG NAb and any F(ab')<sub>2</sub> can mediate excessive complement activation, *Adv Exp Med Biol* 750, 186-196.
168. Jelezarova, E., and Lutz, H. U. (2005) IgG naturally occurring antibodies stabilize and promote the generation of the alternative complement pathway C3 convertase, *Mol Immunol* 42, 1393-1403.
169. Bouaziz, J. D., Yanaba, K., and Tedder, T. F. (2008) Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation, *Immunol Rev* 224, 201-214.
170. Majlessi, L., Lo-Man, R., and Leclerc, C. (2008) Regulatory B and T cells in infections, *Microbes Infect* 10, 1030-1035.
171. Yuseff, M. I., and Lennon-Dumenil, A. M. (2013) Studying MHC class II Presentation of Immobilized Antigen by B Lymphocytes, *Methods Mol Biol* 960, 529-543.
172. college, M. t. B- cell activation, Midland technical college.
173. Picker, L. J. (1993) Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues, *Am Rev Respir Dis* 148, S47-54.
174. Schwarz, B. A., and Bhandoola, A. (2006) Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis, *Immunol Rev* 209, 47-57.
175. Hayday, A. C. (2000) [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection, *Annu Rev Immunol* 18, 975-1026.
176. Hayday, A. C. (2009) Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response, *Immunity* 31, 184-196.
177. Scotet, E., Nedellec, S., Devilder, M. C., Allain, S., and Bonneville, M. (2008) Bridging innate and adaptive immunity through gammadelta T-dendritic cell crosstalk, *Front Biosci* 13, 6872-6885.

178. Youngblood, B., Davis, C. W., and Ahmed, R. (2010) Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells, *Int Immunol* 22, 797-803.
179. Williams, M. A., and Bevan, M. J. (2007) Effector and memory CTL differentiation, *Annu Rev Immunol* 25, 171-192.
180. Oehen, S., and Brduscha-Riem, K. (1998) Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division, *J Immunol* 161, 5338-5346.
181. Wherry, E. J., and Ahmed, R. (2004) Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection, *J Virol* 78, 5535-5545.
182. Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells, *Immunol Rev* 211, 81-92.
183. Homey, B. (2006) [After TH1/TH2 now comes Treg/TH17: significance of T helper cells in immune response organization], *Hautarzt* 57, 730-732.
184. Reinhardt, R. L., Kang, S. J., Liang, H. E., and Locksley, R. M. (2006) T helper cell effector fates--who, how and where?, *Curr Opin Immunol* 18, 271-277.
185. Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages, *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
186. Konig, R., Huang, L. Y., and Germain, R. N. (1992) MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8, *Nature* 356, 796-798.
187. Smith, K. A. (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications, *Science* 240, 1169-1176.
188. Murphy, K. M., and Reiner, S. L. (2002) The lineage decisions of helper T cells, *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
189. Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
190. Glimcher, L. H., and Murphy, K. M. (2000) Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up, *Genes Dev* 14, 1693-1711.
191. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., and Glimcher, L. H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses, *Annu Rev Immunol* 21, 713-758.
192. Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Zhang, M., Mahdi, R. M., Kim, S. J., and Gery, I. (2002) Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance, *J Immunol* 168, 3181-3187.
193. Romagnani, S., Parronchi, P., D'Elia, M. M., Romagnani, P., Annunziato, F., Piccinni, M. P., Manetti, R., Sampognaro, S., Mavilia, C., De Carli, M., Maggi, E., and Del Prete, G. F. (1997) An update on human Th1 and Th2 cells, *Int Arch Allergy Immunol* 113, 153-156.
194. Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease, *Altern Med Rev* 8, 223-246.
195. Dong, C. (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells, *Nat Rev Immunol* 6, 329-333.

196. Kolls, J. K., and Linden, A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation, *Immunity* 21, 467-476.
197. Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, *Nat Immunol* 6, 1133-1141.
198. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol* 4, 330-336.
199. Noma, T. (2010) [Helper T cell paradigm: Th17 and regulatory T cells involved in autoimmune inflammatory disorders, pathogen defense and allergic diseases], *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 33, 262-271.
200. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *J Exp Med* 198, 1875-1886.
201. Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?, *Immunity* 30, 626-635.
202. O'Shea, P. (2010) Helper T cell differentiation, (subset, T. c., Ed.), Science.
203. Balato, A., Unutmaz, D., and Gaspari, A. A. (2009) Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions, *J Invest Dermatol* 129, 1628-1642.
204. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J., and Van Kaer, L. (2004) NKT cells: what's in a name?, *Nat Rev Immunol* 4, 231-237.
205. Taniguchi, M., Harada, M., Kojo, S., Nakayama, T., and Wakao, H. (2003) The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response, *Annu Rev Immunol* 21, 483-513.
206. Zeissig, S., Olszak, T., Melum, E., and Blumberg, R. S. (2013) Analyzing antigen recognition by natural killer T cells, *Methods Mol Biol* 960, 557-572.
207. Van Kaer, L. (2004) Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells, *Immunol Res* 30, 139-153.
208. Daniels, C. B., and Orgeig, S. (2003) Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing, *News Physiol Sci* 18, 151-157.
209. Hiemstra, P. S. (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung, *Exp Lung Res* 33, 537-542.
210. Schutte, B. C., and McCray, P. B., Jr. (2002) [beta]-defensins in lung host defense, *Annu Rev Physiol* 64, 709-748.
211. Jang, B. C., Lim, K. J., Paik, J. H., Kwon, Y. K., Shin, S. W., Kim, S. C., Jung, T. Y., Kwon, T. K., Cho, J. W., Baek, W. K., Kim, S. P., Suh, M. H., and Suh, S. I. (2004) Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB, *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1026-1033.
212. Hiemstra, P. S. (2001) Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation, *Paediatr Respir Rev* 2, 306-310.
213. Travis, S. M., Conway, B. A., Zabner, J., Smith, J. J., Anderson, N. N., Singh, P. K., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1999) Activity of abundant antimicrobials of the human airway, *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 872-879.
214. Dajani, R., Zhang, Y., Taft, P. J., Travis, S. M., Starner, T. D., Olsen, A., Zabner, J., Welsh, M. J., and Engelhardt, J. F. (2005) Lysozyme secretion by

- submucosal glands protects the airway from bacterial infection, *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 548-552.
215. Voynow, J. A., and Rubin, B. K. (2009) Mucins, mucus, and sputum, *Chest* 135, 505-512.
  216. Parker, D., and Prince, A. (2011) Innate immunity in the respiratory epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 189-201.
  217. Ryu, J. H., Kim, C. H., and Yoon, J. H. (2010) Innate immune responses of the airway epithelium, *Mol Cells* 30, 173-183.
  218. Bals, R., and Hiemstra, P. S. (2004) Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens, *Eur Respir J* 23, 327-333.
  219. Muir, A., Soong, G., Sokol, S., Reddy, B., Gomez, M. I., Van Heeckeren, A., and Prince, A. (2004) Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 777-783.
  220. Armstrong, L., Medford, A. R., Uppington, K. M., Robertson, J., Witherden, I. R., Tetley, T. D., and Millar, A. B. (2004) Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 241-245.
  221. Zarembek, K. A., and Godowski, P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines, *J Immunol* 168, 554-561.
  222. Mayer, A. K., Muehmer, M., Mages, J., Gueinzus, K., Hess, C., Heeg, K., Bals, R., Lang, R., and Dalpke, A. H. (2007) Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells, *J Immunol* 178, 3134-3142.
  223. Cole, A. M., Ganz, T., Liese, A. M., Burdick, M. D., Liu, L., and Strieter, R. M. (2001) Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity, *J Immunol* 167, 623-627.
  224. Manicone, A. M., Burkhart, K. M., Lu, B., and Clark, J. G. (2008) CXCR3 ligands contribute to Th1-induced inflammation but not to homing of Th1 cells into the lung, *Exp Lung Res* 34, 391-407.
  225. Gern, J. E., French, D. A., Grindle, K. A., Brockman-Schneider, R. A., Konno, S., and Busse, W. W. (2003) Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 731-737.
  226. De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., and Chertov, O. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells, *J Exp Med* 192, 1069-1074.
  227. Durr, M., and Peschel, A. (2002) Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense, *Infect Immun* 70, 6515-6517.
  228. Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2006) Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation, *J Allergy Clin Immunol* 118, 331-336.
  229. Upham, J. W., and Stick, S. M. (2006) Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation, *Curr Drug Targets* 7, 541-545.

230. Lukacs, N. W., Prosser, D. M., Wiekowski, M., Lira, S. A., and Cook, D. N. (2001) Requirement for the chemokine receptor CCR6 in allergic pulmonary inflammation, *J Exp Med* 194, 551-555.
231. Phadke, A. P., Akangire, G., Park, S. J., Lira, S. A., and Mehrad, B. (2007) The role of CC chemokine receptor 6 in host defense in a model of invasive pulmonary aspergillosis, *Am J Respir Crit Care Med* 175, 1165-1172.
232. Sauty, A., Dziejman, M., Taha, R. A., Iarossi, A. S., Neote, K., Garcia-Zepeda, E. A., Hamid, Q., and Luster, A. D. (1999) The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells, *J Immunol* 162, 3549-3558.
233. Panina-Bordignon, P., Papi, A., Mariani, M., Di Lucia, P., Casoni, G., Bellettato, C., Buonsanti, C., Miotto, D., Mapp, C., Villa, A., Arrigoni, G., Fabbri, L. M., and Sinigaglia, F. (2001) The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics, *J Clin Invest* 107, 1357-1364.
234. Terada, N., Nomura, T., Kim, W. J., Otsuka, Y., Takahashi, R., Kishi, H., Yamashita, T., Sugawara, N., Fukuda, S., Ikeda-Ito, T., and Konno, A. (2001) Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines, *Clin Exp Allergy* 31, 1923-1931.
235. Heijink, I. H., Marcel Kies, P., van Oosterhout, A. J., Postma, D. S., Kauffman, H. F., and Vellenga, E. (2007) Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 351-359.
236. Yang, D., Chen, Q., Hoover, D. M., Staley, P., Tucker, K. D., Lubkowski, J., and Oppenheim, J. J. (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity, *J Leukoc Biol* 74, 448-455.
237. Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikstrom, M. E., and Jahnsen, F. L. (2008) Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract, *Nat Rev Immunol* 8, 142-152.
238. Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., and Holt, P. G. (1998) Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity, *J Exp Med* 188, 2019-2031.
239. Holt, P. G., Reid, M., Britten, D., Sedgwick, J., and Bazin, H. (1987) Suppression of IgE responses by passive antigen inhalation: dissociation of local (mucosal) and systemic immunity, *Cell Immunol* 104, 434-439.
240. Umetsu, D. T., and DeKruyff, R. H. (2006) The regulation of allergy and asthma, *Immunol Rev* 212, 238-255.
241. de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2004) Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen, *J Exp Med* 200, 89-98.
242. Hintzen, G., Ohl, L., del Rio, M. L., Rodriguez-Barbosa, J. I., Pabst, O., Kocks, J. R., Kreye, J., Hardtke, S., and Forster, R. (2006) Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node, *J Immunol* 177, 7346-7354.
243. Strickland, D. H., Stumbles, P. A., Zosky, G. R., Subrata, L. S., Thomas, J. A., Turner, D. J., Sly, P. D., and Holt, P. G. (2006) Reversal of airway

- hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells, *J Exp Med* 203, 2649-2660.
244. Eriksson, U., Egermann, U., Bihl, M. P., Gambazzi, F., Tamm, M., Holt, P. G., and Bingisser, R. M. (2005) Human bronchial epithelium controls TH2 responses by TH1-induced, nitric oxide-mediated STAT5 dephosphorylation: implications for the pathogenesis of asthma, *J Immunol* 175, 2715-2720.
  245. Lambrecht, B. N. (2006) Alveolar macrophage in the driver's seat, *Immunity* 24, 366-368.
  246. Landsman, L., and Jung, S. (2007) Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages, *J Immunol* 179, 3488-3494.
  247. MacLean, J. A., Xia, W., Pinto, C. E., Zhao, L., Liu, H. W., and Kradin, R. L. (1996) Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity, *Am J Pathol* 148, 657-666.
  248. Martin, T. R., and Frevert, C. W. (2005) Innate Immunity in the Lungs, *Proc Am Thoracic Soc* 2, 403-411.
  249. Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N., and Randolph, G. J. (2006) Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways, *J Immunol* 176, 3578-3584.
  250. Thepen, T., McMenamin, C., Oliver, J., Kraal, G., and Holt, P. G. (1991) Regulation of immune response to inhaled antigen by alveolar macrophages: differential effects of in vivo alveolar macrophage elimination on the induction of tolerance vs. immunity, *Eur J Immunol* 21, 2845-2850.
  251. Takabayshi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D., and Raz, E. (2006) Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds, *Immunity* 24, 475-487.
  252. Holt, P. G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P. G., Kraal, G., and Thepen, T. (1993) Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages, *J Exp Med* 177, 397-407.
  253. Gwinn, M. R., and Vallyathan, V. (2006) Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9, 27-39.
  254. Underhill, D. M., and Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action, *Annu Rev Immunol* 20, 825-852.
  255. Wissinger, E., Goulding, J., and Hussell, T. (2009) Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection, *Semin Immunol* 21, 147-155.
  256. Garcia-Ramallo, E., Marques, T., Prats, N., Beleta, J., Kunkel, S. L., and Godessart, N. (2002) Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation, *J Immunol* 169, 6467-6473.
  257. Yoshie, O., Imai, T., and Nomiyama, H. (2001) Chemokines in immunity, *Adv Immunol* 78, 57-110.
  258. Becker, M. N., Diamond, G., Verghese, M. W., and Randell, S. H. (2000) CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium, *J Biol Chem* 275, 29731-29736.

259. Balamayooran, G., Batra, S., Fessler, M. B., Happel, K. I., and Jeyaseelan, S. (2010) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria, *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 5-16.
260. Roth, M. D., and Golub, S. H. (1989) Inhibition of lymphokine-activated killer cell function by human alveolar macrophages, *Cancer Res* 49, 4690-4695.
261. Michel, T., Poli, A., Domingues, O., Mauffray, M., Theresine, M., Brons, N. H., Hentges, F., and Zimmer, J. (2012) Mouse lung and spleen natural killer cells have phenotypic and functional differences, in part influenced by macrophages, *PLoS One* 7, e51230.
262. Bordignon, C., Villa, F., Vecchi, A., Giavazzi, R., Introna, M., Avallone, R., and Mantovani, A. (1982) Natural cytotoxic activity in human lungs, *Clin Exp Immunol* 47, 437-444.
263. Robinson, B. W., Pinkston, P., and Crystal, R. G. (1984) Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent, *J Clin Invest* 74, 942-950.
264. Lauzon, W., and Lemaire, I. (1994) Alveolar macrophage inhibition of lung-associated NK activity: involvement of prostaglandins and transforming growth factor-beta 1, *Exp Lung Res* 20, 331-349.
265. Stein-Streilein, J., Bennett, M., Mann, D., and Kumar, V. (1983) Natural killer cells in mouse lung: surface phenotype, target preference, and response to local influenza virus infection, *J Immunol* 131, 2699-2704.
266. Morrison, B. E., Park, S. J., Mooney, J. M., and Mehrad, B. (2003) Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis, *J Clin Invest* 112, 1862-1870.
267. Kim, S., Iizuka, K., Kang, H. S., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., and Yokoyama, W. M. (2002) In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation, *Nat Immunol* 3, 523-528.
268. He, X. S., Draghi, M., Mahmood, K., Holmes, T. H., Kemble, G. W., Dekker, C. L., Arvin, A. M., Parham, P., and Greenberg, H. B. (2004) T cell-dependent production of IFN-gamma by NK cells in response to influenza A virus, *J Clin Invest* 114, 1812-1819.
269. Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S. E., Safi, H., Lakey, D. L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A., and Barnes, P. F. (2002) The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium, *J Immunol* 168, 3451-3457.
270. Vankayalapati, R., Garg, A., Porgador, A., Griffith, D. E., Klucar, P., Safi, H., Girard, W. M., Cosman, D., Spies, T., and Barnes, P. F. (2005) Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium, *J Immunol* 175, 4611-4617.
271. Kos, F. J., and Engleman, E. G. (1996) Role of natural killer cells in the generation of influenza virus-specific cytotoxic T cells, *Cell Immunol* 173, 1-6.
272. Verbist, K. C., Rose, D. L., Cole, C. J., Field, M. B., and Klonowski, K. D. (2012) IL-15 participates in the respiratory innate immune response to influenza virus infection, *PLoS One* 7, e37539.
273. Vankayalapati, R., Klucar, P., Wizel, B., Weis, S. E., Samten, B., Safi, H., Shams, H., and Barnes, P. F. (2004) NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen, *J Immunol* 172, 130-137.

274. Regamey, N., Obregon, C., Ferrari-Lacraz, S., van Leer, C., Chanson, M., Nicod, L. P., and Geiser, T. (2007) Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 75-84.
275. Vermaelen, K., and Pauwels, R. (2005) Pulmonary dendritic cells, *Am J Respir Crit Care Med* 172, 530-551.
276. Pene, F., Zuber, B., Courtine, E., Rousseau, C., Ouaz, F., Toubiana, J., Tazi, A., Mira, J. P., and Chiche, J. D. (2008) Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction, *J Immunol* 181, 8513-8520.
277. Upham, J. W., Denburg, J. A., and O'Byrne, P. M. (2002) Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects, *Clin Exp Allergy* 32, 818-823.
278. Osterholzer, J. J., Ames, T., Polak, T., Sonstein, J., Moore, B. B., Chensue, S. W., Toews, G. B., and Curtis, J. L. (2005) CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen, *J Immunol* 175, 874-883.
279. Lund, F. E., Hollifield, M., Schuer, K., Lines, J. L., Randall, T. D., and Garvy, B. A. (2006) B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection, *J Immunol* 176, 6147-6154.
280. Fagarasan, S., and Honjo, T. (2000) T-Independent immune response: new aspects of B cell biology, *Science* 290, 89-92.
281. Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002) DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL, *Nat Immunol* 3, 822-829.
282. Kato, A., Truong-Tran, A. Q., Scott, A. L., Matsumoto, K., and Schleimer, R. P. (2006) Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism, *J Immunol* 177, 7164-7172.
283. Kato, A., and Schleimer, R. P. (2007) Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity, *Curr Opin Immunol* 19, 711-720.
284. Kudsk, K. A. (2002) Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition, *Am J Surg* 183, 390-398.
285. Kudsk, K. A., Hermsen, J. L., Genton, L., Faucher, L., and Gomez, F. E. (2008) Injury stimulates an innate respiratory immunoglobulin a immune response in humans, *J Trauma* 64, 316-323; discussion 323-315.
286. Bice, D. E., Williams, A. J., and Muggenburg, B. A. (1996) Long-term antibody production in canine lung allografts: implications in pulmonary immunity and asthma, *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 341-347.
287. Julia, V., Hessel, E. M., Malherbe, L., Glaichenhaus, N., O'Garra, A., and Coffman, R. L. (2002) A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure, *Immunity* 16, 271-283.
288. Hildebrand, F., Mommsen, P., Frink, M., van Griensven, M., and Krettek, C. (2011) Genetic predisposition for development of complications in multiple trauma patients, *Shock* 35, 440-448.
289. Wang, H., and Ma, S. (2008) The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome, *Am J Emerg Med* 26, 711-715.

290. Brochner, A. C., and Toft, P. (2009) Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma, *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 17, 43.
291. Lenz, A., Franklin, G. A., and Cheadle, W. G. (2007) Systemic inflammation after trauma, *Injury* 38, 1336-1345.
292. Keel, M., and Trentz, O. (2005) Pathophysiology of polytrauma, *Injury* 36, 691-709.
293. Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation, *Nature* 420, 846-852.
294. Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., Hayden, D. L., Hennessy, L., Moore, E. E., Minei, J. P., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Brownstein, B. H., Mason, P. H., Baker, H. V., Finnerty, C. C., Jeschke, M. G., Lopez, M. C., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Arnoldo, B., Xu, W., Zhang, Y., Calvano, S. E., McDonald-Smith, G. P., Schoenfeld, D. A., Storey, J. D., Cobb, J. P., Warren, H. S., Moldawer, L. L., Herndon, D. N., Lowry, S. F., Maier, R. V., Davis, R. W., and Tompkins, R. G. (2011) A genomic storm in critically injured humans, *J Exp Med* 208, 2581-2590.
295. Thiel, M. (2000) Inflammation und Immunparalyse Gibt es Unterscheidungskriterien?, *Anaesthesist* 49, 466-471.
296. Moore, F. A., Sauaia, A., Moore, E. E., Haenel, J. B., Burch, J. M., and Lezotte, D. C. (1996) Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon, *J Trauma* 40, 501-510.
297. Tschoeke, S. K., and Ertel, W. (2007) Immunoparalysis after multiple trauma, *Injury* 38, 1346-1357.
298. Waydhas, C., Nast-Kolb, D., Jochum, M., Trupka, A., Lenk, S., Fritz, H., Duswald, K. H., and Schweiberer, L. (1992) Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma, *Arch Surg* 127, 460-467.
299. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family, *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
300. Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y., and Platt, J. L. (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4, *J Immunol* 168, 5233-5239.
301. Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., 3rd. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4, *J Biol Chem* 276, 10229-10233.
302. Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H. J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M. F., Mihalik, D., Gotte, M., Malle, E., Schaefer, R. M., and Grone, H. J. (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages, *J Clin Invest* 115, 2223-2233.
303. Piccinini, A. M., and Midwood, K. S. (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling, *Mediators Inflamm* 2010.
304. Kono, H., and Rock, K. L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger, *Nat Rev Immunol* 8, 279-289.
305. Rock, K. L., and Kono, H. (2008) The inflammatory response to cell death, *Annu Rev Pathol* 3, 99-126.
306. Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature* 464, 104-107.

307. Oppenheim, J. J., Tewary, P., de la Rosa, G., and Yang, D. (2007) Alarmins initiate host defense, *Adv Exp Med Biol* 601, 185-194.
308. Oppenheim, J. J., and Yang, D. (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses, *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
309. Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self, *Science* 296, 301-305.
310. Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger, *J Leukoc Biol* 81, 1-5.
311. Hirsiger, S., Simmen, H. P., Werner, C. M., Wanner, G. A., and Rittirsch, D. (2012) Danger signals activating the immune response after trauma, *Mediators Inflamm* 2012, Article ID 315941.
312. Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B., and Kroemer, G. (2009) Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death, *EMBO J* 28, 578-590.
313. Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., and Tsung, A. (2008) HMGB1: endogenous danger signaling, *Mol Med* 14, 476-484.
314. Cohen, I., Rider, P., Carmi, Y., Braiman, A., Dotan, S., White, M. R., Voronov, E., Martin, M. U., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. (2010) Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2574-2579.
315. Mousson, C., Ortega, N., and Girard, J. P. (2008) The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'?, *PLoS One* 3, e3331.
316. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J. (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules, *Journal of Leukocyte Biology* 81, 28-37.
317. Wallin, R. P., Lundqvist, A., More, S. H., von Bonin, A., Kiessling, R., and Ljunggren, H. G. (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system, *Trends Immunol* 23, 130-135.
318. Flohe, S. B., Bangen, J. M., Flohe, S., Agrawal, H., Bergmann, K., and Schade, F. U. (2007) Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins, *Shock* 27, 494-502.
319. Hubbard, W. J., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. (2004) The role of the mitochondrion in trauma and shock, *Shock* 22, 395-402.
320. Castellheim, A., Brekke, O. L., Espevik, T., Harboe, M., and Mollnes, T. E. (2009) Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis, *Scand J Immunol* 69, 479-491.
321. Partrick, D. A., Moore, F. A., Moore, E. E., Barnett, C. C., Jr., and Silliman, C. C. (1996) Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure, *New Horiz* 4, 194-210.
322. Ito, T., Kawahara, K., Nakamura, T., Yamada, S., Abeyama, K., Hashiguchi, T., and Maruyama, I. (2007) High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats, *J Thromb Haemost* 5, 109-116.
323. Bone, R. C. (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS, *Crit Care Med* 24, 1125-1128.

324. Mack, V. E., McCarter, M. D., Naama, H. A., Calvano, S. E., and Daly, J. M. (1996) Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury, *Arch Surg* 131, 1303-1308.
325. Meert, K. L., Ofenstein, J. P., and Sarnaik, A. P. (1998) Altered T cell cytokine production following mechanical trauma, *Ann Clin Lab Sci* 28, 283-288.
326. Kalicke, T., Schlegel, U., Printzen, G., Schneider, E., Muhr, G., and Arens, S. (2003) Influence of a standardized closed soft tissue trauma on resistance to local infection. An experimental study in rats, *J Orthop Res* 21, 373-378.
327. Kindt, G. C., Gadek, J. E., and Weiland, J. E. (1991) Initial recruitment of neutrophils to alveolar structures in acute lung injury, *J Appl Physiol* 70, 1575-1585.
328. Tanaka, H., Ishikawa, K., Nishino, M., Shimazu, T., and Yoshioka, T. (1996) Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis, *J Trauma* 40, 718-725.
329. Teles, L. M., Aquino, E. N., Neves, A. C., Garcia, C. H., Roepstorff, P., Fontes, B., Castro, M. S., and Fontes, W. (2012) Comparison of the neutrophil proteome in trauma patients and normal controls, *Protein Pept Lett* 19, 663-672.
330. Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Hashiguchi, N., Kuwagata, Y., Hosotsubo, H., Shimazu, T., and Sugimoto, H. (1999) Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients, *J Trauma* 46, 774-781; discussion 781-773.
331. Barkhausen, T., Krettek, C., and van Griensven, M. (2005) L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation, *Exp Toxicol Pathol* 57, 39-52.
332. Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., Kim, F. J., Banerjee, A., and Peterson, V. M. (1995) Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window, *Surgery* 118, 358-364.
333. Kawasaki, T., Kobayashi, M., Herndon, D. N., and Suzuki, F. (2010) Role of natural killer dendritic cells in host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* infection after thermal injury in mice, *Shock* 34, 83-89.
334. Takahashi, H., Tsuda, Y., Takeuchi, D., Kobayashi, M., Herndon, D. N., and Suzuki, F. (2004) Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections, *Crit Care Med* 32, 1879-1885.
335. Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., and Suzuki, F. (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Immunity* 21, 215-226.
336. Southard, R., Ghosh, S., Hilliard, J., Davis, C., Mazuski, C., Walton, A., and Hotchkiss, R. (2012) Pulmonary contusion is associated with toll-like receptor 4 upregulation and decreased susceptibility to *Pseudomonas pneumonia* in a mouse model, *Shock* 37, 629-633.
337. Skerrett, S. J., Liggitt, H. D., Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Miller, S. I., and Wilson, C. B. (2004) Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, 143-152.
338. Lu, W., Hisatsune, A., Koga, T., Kato, K., Kuwahara, I., Lillehoj, E. P., Chen, W., Cross, A. S., Gendler, S. J., Gewirtz, A. T., and Kim, K. C. (2006) Cutting edge: enhanced pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by Muc1 knockout mice, *J Immunol* 176, 3890-3894.

339. Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., and Prince, A. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5, *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 627-634.
340. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408, 740-745.
341. Wesselkamper, S. C., Eppert, B. L., Motz, G. T., Lau, G. W., Hassett, D. J., and Borchers, M. T. (2008) NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection, *J Immunol* 181, 5481-5489.
342. Borchers, M. T., Harris, N. L., Wesselkamper, S. C., Zhang, S., Chen, Y., Young, L., and Lau, G. W. (2006) The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun* 74, 2578-2586.
343. Koh, A. Y., Priebe, G. P., Ray, C., Van Rooijen, N., and Pier, G. B. (2009) Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Infect Immun* 77, 5300-5310.
344. Mizgerd, J. P. (2002) Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs, *Semin Immunol* 14, 123-132.
345. Tsai, W. C., Strieter, R. M., Mehrad, B., Newstead, M. W., Zeng, X., and Standiford, T. J. (2000) CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Infect Immun* 68, 4289-4296.
346. Cheung, D. O., Halsey, K., and Speert, D. P. (2000) Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun* 68, 4585-4592.
347. Kooguchi, K., Hashimoto, S., Kobayashi, A., Kitamura, Y., Kudoh, I., Wiener-Kronish, J., and Sawa, T. (1998) Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Infect Immun* 66, 3164-3169.
348. Hashimoto, S., Pittet, J. F., Hong, K., Folkesson, H., Bagby, G., Kobzik, L., Frevert, C., Watanabe, K., Tsurufuji, S., and Wiener-Kronish, J. (1996) Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections, *Am J Physiol* 270, 819-828.
349. Kannan, S., Huang, H., Seeger, D., Audet, A., Chen, Y., Huang, C., Gao, H., Li, S., and Wu, M. (2009) Alveolar epithelial type II cells activate alveolar macrophages and mitigate *P. Aeruginosa* infection, *PLoS One* 4, e4891.
350. Fujimoto, J., Wiener-Kronish, J. P., Hashimoto, S., and Sawa, T. (2002) Effects of CI2MDP-encapsulating liposomes in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced sepsis, *J Liposome Res* 12, 239-257.
351. Daigneault, M., De Silva, T. I., Bewley, M. A., Preston, J. A., Marriott, H. M., Mitchell, A. M., Mitchell, T. J., Read, R. C., Whyte, M. K., and Dockrell, D. H. (2012) Monocytes regulate the mechanism of T-cell death by inducing Fas-mediated apoptosis during bacterial infection, *PLoS Pathog* 8, e1002814.
352. Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., and Pamer, E. G. (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens, *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.
353. Taylor, P. R., and Gordon, S. (2003) Monocyte heterogeneity and innate immunity, *Immunity* 19, 2-4.

354. Liu, J., Feng, Y., Yang, K., Li, Q., Ye, L., Han, L., and Wan, H. (2011) Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice, *FEMS Immunol Med Microbiol* 61, 179-188.
355. Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Exley, M., Schleipman, R. A., Glickman, J., Bailey, D. T., Corazza, N., Colgan, S. P., Onderdonk, A. B., and Blumberg, R. S. (2002) CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung, *Nat Med* 8, 588-593.
356. Eppert, B. L., Motz, G. T., Wortham, B. W., Flury, J. L., and Borchers, M. T. (2010) CCR7 deficiency leads to leukocyte activation and increased clearance in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Infect Immun* 78, 2099-2107.
357. Hildebrand, F., Flohe, S., Leenen, L., van Griensven, M., and Frink, M. (2012) Posttraumatic immune response and its modulation, *Mediators Inflamm* 2012, 731563.
358. Regel, G., Grotz, M., Weltner, T., Sturm, J. A., and Tscherne, H. (1996) Pattern of organ failure following severe trauma, *World J Surg* 20, 422-429.
359. Lomas-Neira, J. L., Chung, C. S., Grutkoski, P. S., Miller, E. J., and Ayala, A. (2004) CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice, *J Leukoc Biol* 76, 58-64.
360. Angele, M. K., and Faist, E. (2002) Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, *Crit Care* 6, 298-305.
361. Volk, H. D. (2002) Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection, *Crit Care* 6, 279-281.
362. Perl, M., Lomas-Neira, J., Venet, F., Chung, C. S., and Ayala, A. (2011) Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury, *Expert Rev Respir Med* 5, 115-126.
363. Brun-Buisson, C., Minelli, C., Bertolini, G., Brazzi, L., Pimentel, J., Lewandowski, K., Bion, J., Romand, J. A., Villar, J., Thorsteinsson, A., Damas, P., Armaganidis, A., and Lemaire, F. (2004) Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study, *Intensive Care Med* 30, 51-61.
364. Matute-Bello, G., Frevert, C. W., and Martin, T. R. (2008) Animal models of acute lung injury, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, 379-399.
365. Wang, H. M., Bodenstein, M., and Markstaller, K. (2008) Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury, *Eur Surg Res* 40, 305-316.
366. Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J. R., Morris, A., and Spragg, R. (1994) The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination, *Am J Respir Crit Care Med* 149, 818-824.
367. Ferguson, N. D., Fan, E., Camporota, L., Antonelli, M., Anzueto, A., Beale, R., Brochard, L., Brower, R., Esteban, A., Gattinoni, L., Rhodes, A., Slutsky, A. S., Vincent, J. L., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., and Ranieri, V. M. (2012) The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material, *Intensive Care Med* 38, 1573-1582.
368. Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B. T., Ferguson, N. D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., and Slutsky, A. S. (2012) Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition, *JAMA* 307, 2526-2533.

369. Villar, J. (2011) What is the acute respiratory distress syndrome?, *Respir Care* 56, 1539-1545.
370. Wheeler, A. P., and Bernard, G. R. (2007) Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review, *Lancet* 369, 1553-1564.
371. Ware, L. B., and Matthay, M. A. (2000) The acute respiratory distress syndrome, *N Engl J Med* 342, 1334-1349.
372. Bachofen, M., and Weibel, E. R. (1982) Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome, *Clin Chest Med* 3, 35-56.
373. Capelozzi, V. L. (2008) What have anatomic and pathologic studies taught us about acute lung injury and acute respiratory distress syndrome?, *Curr Opin Crit Care* 14, 56-63.
374. Martin, T. R., and Matute-Bello, G. (2011) Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury, *Crit Care Clin* 27, 735-752.
375. Zapata-Sirvent, R. L., Hansbrough, J. F., Cox, M. C., and Carter, W. H. (1992) Immunologic alterations in a murine model of hemorrhagic shock, *Crit Care Med* 20, 508-517.
376. Schwacha, M. G. (2003) Macrophages and post-burn immune dysfunction, *Burns* 29, 1-14.
377. Baue, A. E., Durham, R., and 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.
378. Matthay, M. A., and Zemans, R. L. (2011) The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment, *Annu Rev Pathol* 6, 147-163.
379. Ayala, A., Chung, C. S., Lomas, J. L., Song, G. Y., Doughty, L. A., Gregory, S. H., Cioffi, W. G., LeBlanc, B. W., Reichner, J., Simms, H. H., and Grutkoski, P. S. (2002) Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency, *Am J Pathol* 161, 2283-2294.
380. Doerschuk, C. M. (2001) Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs, *Microcirculation* 8, 71-88.
381. Abraham, E. (2003) Neutrophils and acute lung injury, *Crit Care Med* 31, S195-199.
382. Martin, T. R. (2002) Neutrophils and lung injury: getting it right, *J Clin Invest* 110, 1603-1605.
383. Lomas-Neira, J., Chung, C. S., Perl, M., Gregory, S., Biffl, W., and Ayala, A. (2006) Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L51-58.
384. Looney, M. R., Su, X., Van Ziffle, J. A., Lowell, C. A., and Matthay, M. A. (2006) Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury, *J Clin Invest* 116, 1615-1623.
385. Stephens, K. E., Ishizaka, A., Wu, Z. H., Larrick, J. W., and Raffin, T. A. (1988) Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs, *Am Rev Respir Dis* 138, 1300-1307.
386. Lafe, M. D., Simon, R. H., Flint, A., and Keller, J. B. (1986) Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients, *Am J Med* 80, 1022-1026.
387. Ognibene, F. P., Martin, S. E., Parker, M. M., Schlesinger, T., Roach, P., Burch, C., Shelhamer, J. H., and Parrillo, J. E. (1986) Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia, *N Engl J Med* 315, 547-551.

388. Wiener-Kronish, J. P., Albertine, K. H., and Matthay, M. A. (1991) Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin, *J Clin Invest* 88, 864-875.
389. Walker, D. C., Behzad, A. R., and Chu, F. (1995) Neutrophil migration through preexisting holes in the basal laminae of alveolar capillaries and epithelium during streptococcal pneumonia, *Microvasc Res* 50, 397-416.
390. Modelska, K., Pittet, J. F., Folkesson, H. G., Courtney Broaddus, V., and Matthay, M. A. (1999) Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits, *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1450-1456.
391. Perl, M., Chung, C. S., Perl, U., Lomas-Neira, J., de Paepe, M., Cioffi, W. G., and Ayala, A. (2007) Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury, *Am J Respir Crit Care Med* 176, 591-601.
392. Lee, K. S., Choi, Y. H., Kim, Y. S., Baik, S. H., Oh, Y. J., Sheen, S. S., Park, J. H., Hwang, S. C., and Park, K. J. (2008) Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients with regard to apoptosis, *Respir Med* 102, 464-469.
393. Pespeni, M., Mackersie, R. C., Lee, H., Morabito, D., Hodnett, M., Howard, M., and Pittet, J.-F. o. (2005) Serum Levels of Hsp60 Correlate with the Development of Acute Lung Injury after Trauma<sup>1</sup>, *The Journal of surgical research* 126, 41-47.
394. Maniatis, N. A., Kotanidou, A., Catravas, J. D., and Orfanos, S. E. (2008) Endothelial pathomechanisms in acute lung injury, *Vascul Pharmacol* 49, 119-133.
395. Venet, F., Chung, C. S., Huang, X., Lomas-Neira, J., Chen, Y., and Ayala, A. (2009) Lymphocytes in the development of lung inflammation: a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in indirect pulmonary lung injury, *J Immunol* 183, 3472-3480.
396. D'Alessio, F. R., Tsushima, K., Aggarwal, N. R., West, E. E., Willett, M. H., Britos, M. F., Pipeling, M. R., Brower, R. G., Tuder, R. M., McDyer, J. F., and King, L. S. (2009) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury, *J Clin Invest* 119, 2898-2913.
397. Venet, F., Huang, X., Chung, C. S., Chen, Y., and Ayala, A. (2010) Plasmacytoid dendritic cells control lung inflammation and monocyte recruitment in indirect acute lung injury in mice, *Am J Pathol* 176, 764-773.
398. Blank, R., and Napolitano, L. M. (2011) Epidemiology of ARDS and ALI, *Crit Care Clin* 27, 439-458.
399. Strecker, W., Gebhard, F., Rager, J., Bruckner, U. B., Steinbach, G., and Kinzl, L. (1999) Early biochemical characterization of soft-tissue trauma and fracture trauma, *J Trauma* 47, 358-364.
400. MacConmara, M. P., Maung, A. A., Fujimi, S., McKenna, A. M., Delisle, A., Lapchak, P. H., Rogers, S., Lederer, J. A., and Mannick, J. A. (2006) Increased CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity, *Ann Surg* 244, 514-523.
401. Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., and Miyazaki, M. (2010) Immunosuppression following surgical and traumatic injury, *Surg Today* 40, 793-808.
402. Menzel, C. L., Pfeifer, R., Darwiche, S. S., Kobbe, P., Gill, R., Shapiro, R. A., Loughran, P., Vodovotz, Y., Scott, M. J., Zenati, M. S., Billiar, T. R., and Pape,

- H. C. (2011) Models of lower extremity damage in mice: time course of organ damage and immune response, *J Surg Res* 166, 149-156.
403. Kobbe, P., Vodovotz, Y., Kaczorowski, D. J., Billiar, T. R., and Pape, H. C. (2008) The role of fracture-associated soft tissue injury in the induction of systemic inflammation and remote organ dysfunction after bilateral femur fracture, *J Orthop Trauma* 22, 385-390.
404. Flohe, S. B., Flohe, S., and Schade, F. U. (2008) Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms, *Innate Immun* 14, 333-344.
405. Tidball, J. G., and Villalta, S. A. (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, 1173-1187.
406. Mann, A., and Early, G. L. (2012) Acute respiratory distress syndrome, *Mo Med* 109, 371-375.
407. Calfee, C. S., Eisner, M. D., Ware, L. B., Thompson, B. T., Parsons, P. E., Wheeler, A. P., Korpak, A., and Matthay, M. A. (2007) Trauma-associated lung injury differs clinically and biologically from acute lung injury due to other clinical disorders, *Crit Care Med* 35, 2243-2250.
408. Roumen, R. M., Hendriks, T., van der Ven-Jongekrijg, J., Nieuwenhuijzen, G. A., Sauerwein, R. W., van der Meer, J. W., and Goris, R. J. (1993) Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure, *Ann Surg* 218, 769-776.
409. Huard, J., Li, Y., and Fu, F. H. (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research, *J Bone Joint Surg Am* 84-A, 822-832.
410. Brigitte, M., Schilte, C., Plonquet, A., Baba-Amer, Y., Henri, A., Charlier, C., Tajbakhsh, S., Albert, M., Gherardi, R. K., and Chretien, F. (2010) Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury, *Arthritis Rheum* 62, 268-279.
411. Chazaud, B., Brigitte, M., Yacoub-Youssef, H., Arnold, L., Gherardi, R., Sonnet, C., Lafuste, P., and Chretien, F. (2009) Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration, *Exerc Sport Sci Rev* 37, 18-22.
412. Tidball, J. G. (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, 345-353.
413. Nahirney, P. C., Dow, P. R., and Ovalle, W. K. (1997) Quantitative morphology of mast cells in skeletal muscle of normal and genetically dystrophic mice, *Anat Rec* 247, 341-349.
414. Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R. K., and Chazaud, B. (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis, *J Exp Med* 204, 1057-1069.
415. Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T., and Pavlath, G. K. (2003) IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth, *Cell* 113, 483-494.
416. Wynn, T. A., and Barron, L. (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin Liver Dis* 30, 245-257.
417. Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function, *Immunity* 9, 143-150.

418. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product, *J Immunol* 162, 3749-3752.
419. Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, N. M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2002) Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice, *J Immunol* 169, 3863-3868.
420. Crisco, J. J., Jokl, P., Heinen, G. T., Connell, M. D., and Panjabi, M. M. (1994) A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology, *Am J Sports Med* 22, 702-710.
421. Versuchstierkunde, G. f. r. (2009) Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren.
422. Laborwelt, M. G., modifiziert. (2012) Lange Leuchtdauern für schnelle Analysen – ReadyFlow, (Durchflusszytometrie, M. d., Ed.) 01/12 ed.
423. Babior, B. M. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction, *Blood* 64, 959-966.
424. signaling, c. sandwich elisa.
425. Davis, K. A., Santaniello, J. M., He, L. K., Muthu, K., Sen, S., Jones, S. B., Gamelli, R. L., and Shankar, R. (2004) Burn injury and pulmonary sepsis: development of a clinically relevant model, *J Trauma* 56, 272-278.
426. Barkhausen, T., Frerker, C., Putz, C., Pape, H. C., Krettek, C., and van Griensven, M. (2008) Depletion of NK cells in a murine polytrauma model is associated with improved outcome and a modulation of the inflammatory response, *Shock* 30, 401-410.
427. Levy, R. M., Prince, J. M., Yang, R., Mollen, K. P., Liao, H., Watson, G. A., Fink, M. P., Vodovotz, Y., and Billiar, T. R. (2006) Systemic inflammation and remote organ damage following bilateral femur fracture requires Toll-like receptor 4, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291, 970-976.
428. Tassiopoulos, A. K., Carlin, R. E., Gao, Y., Pedoto, A., Finck, C. M., Landas, S. K., Tice, D. G., Marx, W., Hakim, T. S., and McGraw, D. J. (1997) Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities, *J Vasc Surg* 26, 647-656.
429. Flohe, S., Flohe, S. B., Schade, F. U., and Waydhas, C. (2007) Immune response of severely injured patients--influence of surgical intervention and therapeutic impact, *Langenbecks Arch Surg* 392, 639-648.
430. Matthay, M. A., Zimmerman, G. A., Esmon, C., Bhattacharya, J., Coller, B., Doerschuk, C. M., Floros, J., Gimbrone, M. A., Jr., Hoffman, E., Hubmayr, R. D., Leppert, M., Matalon, S., Munford, R., Parsons, P., Slutsky, A. S., Tracey, K. J., Ward, P., Gail, D. B., and Harabin, A. L. (2003) Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group, *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1027-1035.
431. Frink, M., Hsieh, Y. C., Hsieh, C. H., Pape, H. C., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., and Chaudry, I. H. (2007) Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage, *Shock* 28, 576-581.
432. Dhaliwal, K., Scholefield, E., Ferenbach, D., Gibbons, M., Duffin, R., Dorward, D. A., Morris, A. C., Humphries, D., MacKinnon, A., Wilkinson, T. S., Wallace,

- W. A., van Rooijen, N., Mack, M., Rossi, A. G., Davidson, D. J., Hirani, N., Hughes, J., Haslett, C., and Simpson, A. J. (2012) Monocytes control second-phase neutrophil emigration in established lipopolysaccharide-induced murine lung injury, *Am J Respir Crit Care Med* 186, 514-524.
433. Kaynar, G., Yurdakan, G., Comert, F., and Yilmaz-Sipahi, E. (2012) Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligand Ro5-4864 in four animal models of acute lung injury, *J Surg Res* 182, 277-284.
434. Chen, C., Zhang, F., Zhang, Z., Peng, M., Wang, Y., and Chen, Y. (2012) TLR4 signaling-induced heme oxygenase upregulation in the acute lung injury: role in hemorrhagic shock and two-hit induced lung inflammation, *Mol Biol Rep* 40, 1167-1172.
435. Ning, J. L., Mo, L. W., Lu, K. Z., Lai, X. N., Wang, Z. G., and Ma, D. (2012) Lung injury following lower extremity blast trauma in rats, *J Trauma Acute Care Surg* 73, 1535-1542.
436. Bird, M. D., Morgan, M. O., Ramirez, L., Yong, S., and Kovacs, E. J. (2010) Decreased pulmonary inflammation after ethanol exposure and burn injury in intercellular adhesion molecule-1 knockout mice, *J Burn Care Res* 31, 652-660.
437. Inoue, S., Nakao, A., Kishimoto, W., Murakami, H., Itoh, K., Itoh, T., Harada, A., Nonami, T., and Takagi, H. (1995) Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis, *Arch Surg* 130, 93-98.
438. Monaghan, S. F., Thakkar, R. K., Heffernan, D. S., Huang, X., Chung, C. S., Lomas-Neira, J., Cioffi, W. G., and Ayala, A. (2012) Mechanisms of indirect acute lung injury: a novel role for the coinhibitory receptor, programmed death-1, *Ann Surg* 255, 158-164.
439. Lomas, J. L., Chung, C. S., Grutkoski, P. S., LeBlanc, B. W., Lavigne, L., Reichner, J., Gregory, S. H., Doughty, L. A., Cioffi, W. G., and Ayala, A. (2003) Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice, *Shock* 19, 358-365.
440. Schmitz, D., Bangen, J. M., Herborn, C. U., Husain, B., Lendemans, S., Flohe, S. B., Metz, K. A., Schade, F. U., Taeger, G., Oberbeck, J. R., Kobbe, P., Waydhas, C., and Flohe, S. (2010) Isolated closed minor-muscle injury of the lower leg did not cause an obvious systemic immune response, *Inflamm Res* 59, 141-149.
441. Hansbrough, J. F., Wikstrom, T., Braide, M., Tenenhaus, M., Rennekampff, O. H., Kiessig, V., and Bjursten, L. M. (1996) Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury, *J Surg Res* 61, 17-22.
442. Timlin, M., Condron, C., Toomey, D., Power, C., Thornes, B., Kearns, S., Street, J., Murray, P., and Bouchier-Hayes, D. (2004) N-acetylcysteine attenuates lung injury in a rodent model of fracture, *Acta Orthop Scand* 75, 61-65.
443. Kobbe, P., Vodovotz, Y., Kaczorowski, D. J., Mollen, K. P., Billiar, T. R., and Pape, H. C. (2008) Patterns of cytokine release and evolution of remote organ dysfunction after bilateral femur fracture, *Shock* 30, 43-47.
444. Kobbe, P., Kaczorowski, D. J., Vodovotz, Y., Tzioupis, C. H., Mollen, K. P., Billiar, T. R., and Pape, H. C. (2008) Local exposure of bone components to

- injured soft tissue induces Toll-like receptor 4-dependent systemic inflammation with acute lung injury, *Shock* 30, 686-691.
445. Stengle, J., Meyers, R., Pyle, J., and Dries, D. J. (1996) Neutrophil recruitment after remote scald injury, *J Burn Care Rehabil* 17, 14-18.
  446. Hansson, M., Olsson, I., and Nauseef, W. M. (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase, *Arch Biochem Biophys* 445, 214-224.
  447. Martin, T. R., Pistorese, B. P., Chi, E. Y., Goodman, R. B., and Matthay, M. A. (1989) Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability, *J Clin Invest* 84, 1609-1619.
  448. Timlin, M., Toomey, D., Condron, C., Power, C., Street, J., Murray, P., and Bouchier-Hayes, D. (2005) Fracture hematoma is a potent proinflammatory mediator of neutrophil function, *J Trauma* 58, 1223-1229.
  449. Maekawa, K., Futami, S., Nishida, M., Terada, T., Inagawa, H., Suzuki, S., and Ono, K. (1998) Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b, *J Trauma* 44, 460-468.
  450. Shijo, H., Iwabuchi, K., Hosoda, S., Watanabe, H., Nagaoka, I., and Sakakibara, N. (1998) Evaluation of neutrophil functions after experimental abdominal surgical trauma, *Inflamm Res* 47, 67-74.
  451. Tassiopoulos, A. K., Hakim, T. S., Finck, C. M., Pedoto, A., Hodell, M. G., Landas, S. K., and McGraw, D. J. (1998) Neutrophil sequestration in the lung following acute aortic occlusion starts during ischaemia and can be attenuated by tumour necrosis factor and nitric oxide blockade, *Eur J Vasc Endovasc Surg* 16, 36-42.
  452. Bird, M. D., and Kovacs, E. J. (2008) Organ-specific inflammation following acute ethanol and burn injury, *J Leukoc Biol* 84, 607-613.
  453. Parsey, M. V., Kaneko, D., Shenkar, R., and Abraham, E. (1999) Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1beta, *Clin Immunol* 91, 219-225.
  454. Adams, J. M., Hauser, C. J., Adams, C. A., Jr., Xu, D. Z., Livingston, D. H., and Deitch, E. A. (2001) Entry of gut lymph into the circulation primes rat neutrophil respiratory burst in hemorrhagic shock, *Crit Care Med* 29, 2194-2198.
  455. Steinberg, K. P., Milberg, J. A., Martin, T. R., Maunder, R. J., Cockrill, B. A., and Hudson, L. D. (1994) Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome, *Am J Respir Crit Care Med* 150, 113-122.
  456. Abraham, E., Carmody, A., Shenkar, R., and Arcaroli, J. (2000) Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, 1137-1145.
  457. Grommes, J., and Soehnlein, O. (2011) Contribution of neutrophils to acute lung injury, *Mol Med* 17, 293-307.
  458. Kollef, M. H., and Schuster, D. P. (1995) The acute respiratory distress syndrome, *N Engl J Med* 332, 27-37.
  459. Barletta, K. E., Cagnina, R. E., Wallace, K. L., Ramos, S. I., Mehrad, B., and Linden, J. (2012) Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury, *J Immunol Methods* 375, 100-110.
  460. Chitnis, D., Dickerson, C., Munster, A. M., and Winchurch, R. A. (1996) Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients, *J Leukoc Biol* 59, 835-839.

461. Paunel-Gorgulu, A., Flohe, S., Scholz, M., Windolf, J., and Logters, T. (2011) Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis, *Crit Care* 15, 20.
462. Harter, L., Mica, L., Stocker, R., Trentz, O., and Keel, M. (2003) Mcl-1 correlates with reduced apoptosis in neutrophils from patients with sepsis, *J Am Coll Surg* 197, 964-973.
463. Taneja, R., Parodo, J., Jia, S. H., Kapus, A., Rotstein, O. D., and Marshall, J. C. (2004) Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity, *Crit Care Med* 32, 1460-1469.
464. Savill, J. (1997) Apoptosis in resolution of inflammation, *J Leukoc Biol* 61, 375-380.
465. Ramaiah, S. K., and Jaeschke, H. (2007) Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury, *Toxicol Pathol* 35, 757-766.
466. Thakkar, R. K., Chung, C. S., Chen, Y., Monaghan, S. F., Lomas-Neira, J., Heffernan, D. S., Cioffi, W. G., and Ayala, A. (2011) Local tissue expression of the cell death ligand, fas ligand, plays a central role in the development of extrapulmonary acute lung injury, *Shock* 36, 138-143.
467. Kuligowski, M. P., Kitching, A. R., and Hickey, M. J. (2006) Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling, *J Immunol* 176, 6991-6999.
468. Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., and Springer, T. A. (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18), *J Cell Biol* 111, 3129-3139.
469. Arnaout, M. A., Todd, R. F., 3rd, Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S. F., and Colten, H. R. (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol), *J Clin Invest* 72, 171-179.
470. Solovjov, D. A., Pluskota, E., and Plow, E. F. (2005) Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2, *J Biol Chem* 280, 1336-1345.
471. Fujimoto, H., Sakata, T., Hamaguchi, Y., Shiga, S., Tohyama, K., Ichiyama, S., Wang, F. S., and Houwen, B. (2000) Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations, *Cytometry* 42, 371-378.
472. van Wessem, K. J., Heeres, M., Leliefeld, P. H., Koenderman, L., and Leenen, L. P. (2013) Lipopolysaccharide and hemorrhagic shock cause systemic inflammation by different mechanisms, *J Trauma Acute Care Surg* 74, 37-43; discussion 43-34.
473. Hoth, J. J., Wells, J. D., Hiltbold, E. M., McCall, C. E., and Yoza, B. K. (2011) Mechanism of neutrophil recruitment to the lung after pulmonary contusion, *Shock* 35, 604-609.
474. Lieberman, M. M., Sachanandani, D. M., and Pinney, C. A. (1996) Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry, *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 654-662.
475. Henrich, D., Zimmer, S., Seebach, C., Frank, J., Barker, J., and Marzi, I. (2011) Trauma-activated polymorphonucleated leukocytes damage endothelial progenitor cells: probable role of CD11b/CD18-CD54 interaction and release of reactive oxygen species, *Shock* 36, 216-222.

476. Lavoie, E. G., Wangdi, T., and Kazmierczak, B. I. (2011) Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Microbes Infect* 13, 1133-1145.
477. Antonelli, M., Bonten, M., Cecconi, M., Chastre, J., Citerio, G., Conti, G., Curtis, J. R., Hedenstierna, G., Joannidis, M., Macrae, D., Maggiore, S. M., Mancebo, J., Mebazaa, A., Preiser, J. C., Rocco, P., Timsit, J. F., Wernerman, J., and Zhang, H. (2013) Year in review in Intensive Care Medicine 2012. II: Pneumonia and infection, sepsis, coagulation, hemodynamics, cardiovascular and microcirculation, critical care organization, imaging, ethics and legal issues, *Intensive Care Med* 39, 345-364.
478. Van Eldere, J. (2003) Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections, *J Antimicrob Chemother* 51, 347-352.
479. Goel, V., Hogade, S. A., and Karadesai, S. (2012) Ventilator associated pneumonia in a medical intensive care unit: Microbial aetiology, susceptibility patterns of isolated microorganisms and outcome, *Indian J Anaesth* 56, 558-562.
480. Chastre, J., and Fagon, J. Y. (2002) Ventilator-associated pneumonia, *Am J Respir Crit Care Med* 165, 867-903.
481. Gaynes, R., and Edwards, J. R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli, *Clin Infect Dis* 41, 848-854.
482. Lighvani, S., Huang, X., Trivedi, P. P., Swanborg, R. H., and Hazlett, L. D. (2005) Substance P regulates natural killer cell interferon-gamma production and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Eur J Immunol* 35, 1567-1575.
483. Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., and Rodeck, U. (1995) Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1, *J Immunol* 155, 1066-1073.
484. Benabid, R., Wartelle, J., Malleret, L., Guyot, N., Gangloff, S., Lebagry, F., and Belaaouaj, A. (2012) Neutrophil elastase modulates cytokine expression: contribution to host defense against *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia, *J Biol Chem* 287, 34883-34894.
485. Hoth JJ, M. R., Yoza BK, Wells JD, Meredith JW, McCall CE. (2009) Pulmonary contusion primes systemic innate immunity responses., *J Trauma*. 67, 14-21.
486. Hauser, C. J., Zhou, X., Joshi, P., Cuchens, M. A., Kregor, P., Devidas, M., Kennedy, R. J., Poole, G. V., and Hughes, J. L. (1997) The immune microenvironment of human fracture/soft-tissue hematomas and its relationship to systemic immunity, *J Trauma* 42, 895-903.
487. Hauser, C. J., Joshi, P., Zhou, X., Kregor, P., Hardy, K. J., Devidas, M., Scott, P., and Hughes, J. L. (1996) Production of interleukin-10 in human fracture soft-tissue hematomas, *Shock* 6, 3-6.
488. Pape, H. C., Griensven, M. V., Hildebrand, F. F., Tzioupis, C. T., Sommer, K. L., Krettek, C. C., and Giannoudis, P. V. (2008) Systemic inflammatory response after extremity or truncal fracture operations, *J Trauma* 65, 1379-1384.
489. Lotze, M. T., and Tracey, K. J. (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal, *Nat Rev Immunol* 5, 331-342.
490. Hauser, C. J., Sursal, T., Rodriguez, E. K., Appleton, P. T., Zhang, Q., and Itagaki, K. (2010) Mitochondrial damage associated molecular patterns from

- femoral reamings activate neutrophils through formyl peptide receptors and P44/42 MAP kinase, *J Orthop Trauma* 24, 534-538.
491. Raouf, M., Zhang, Q., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010) Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1, *J Trauma* 68, 1328-1332; discussion 1332-1324.
  492. Zhang, Q., Itagaki, K., and Hauser, C. J. (2010) Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase, *Shock* 34, 55-59.
  493. Prince, L. R., Whyte, M. K., Sabroe, I., and Parker, L. C. (2011) The role of TLRs in neutrophil activation, *Curr Opin Pharmacol* 11, 397-403.
  494. Sabroe, I., Dower, S. K., and Whyte, M. K. (2005) The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis, *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7, 421-426.
  495. Hayashi, F., Means, T. K., and Luster, A. D. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function, *Blood* 102, 2660-2669.
  496. Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K., and Dower, S. K. (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses, *J Immunol* 168, 4701-4710.
  497. Sabroe, I., Prince, L. R., Jones, E. C., Horsburgh, M. J., Foster, S. J., Vogel, S. N., Dower, S. K., and Whyte, M. K. (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span, *J Immunol* 170, 5268-5275.
  498. Mollen, K. P., Anand, R. J., Tsung, A., Prince, J. M., Levy, R. M., and Billiar, T. R. (2006) Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage, *Shock* 26, 430-437.
  499. Barsness, K. A., Arcaroli, J., Harken, A. H., Abraham, E., Banerjee, A., Reznikov, L., and McIntyre, R. C. (2004) Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, 592-599.
  500. Chen, L. W., Chang, W. J., Chen, P. H., Liu, W. C., and Hsu, C. M. (2008) TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through TNF-alpha signaling, *Shock* 30, 563-570.
  501. Levy, R. M., Mollen, K. P., Prince, J. M., Kaczorowski, D. J., Vallabhaneni, R., Liu, S., Tracey, K. J., Lotze, M. T., Hackam, D. J., Fink, M. P., Vodovotz, Y., and Billiar, T. R. (2007) Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, 1538-1544.
  502. Hua, F., Ma, J., Ha, T., Xia, Y., Kelley, J., Williams, D. L., Kao, R. L., Browder, I. W., Schweitzer, J. B., Kalbfleisch, J. H., and Li, C. (2007) Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion, *J Neuroimmunol* 190, 101-111.
  503. Cao, C. X., Yang, Q. W., Lv, F. L., Cui, J., Fu, H. B., and Wang, J. Z. (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice, *Biochem Biophys Res Commun* 353, 509-514.
  504. Lu, C., Liu, L., Chen, Y., Ha, T., Kelley, J., Schweitzer, J., Kalbfleisch, J. H., Kao, R. L., Williams, D. L., and Li, C. (2011) TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling, *J Immunol* 187, 1458-1466.
  505. Hua, F., Ma, J., Ha, T., Kelley, J., Williams, D. L., Kao, R. L., Kalbfleisch, J. H., Browder, I. W., and Li, C. (2008) Preconditioning with a TLR2 specific ligand

- increases resistance to cerebral ischemia/reperfusion injury, *J Neuroimmunol* 199, 75-82.
506. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells, *J Immunol* 164, 5998-6004.
  507. Lin, Y., Lee, H., Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L., and Scherer, P. E. (2000) The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes, *J Biol Chem* 275, 24255-24263.
  508. Kurt-Jones, E. A., Mandell, L., Whitney, C., Padgett, A., Gosselin, K., Newburger, P. E., and Finberg, R. W. (2002) Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils, *Blood* 100, 1860-1868.
  509. Hennessy, E. J., Parker, A. E., and O'Neill, L. A. (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?, *Nat Rev Drug Discov* 9, 293-307.
  510. O'Neill, L. A., and Bowie, A. G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol* 7, 353-364.
  511. Victoni, T., Coelho, F. R., Soares, A. L., de Freitas, A., Secher, T., Guabiraba, R., Erard, F., de Oliveira-Filho, R. M., Vargaftig, B. B., Lauvaux, G., Kamal, M. A., Ryffel, B., Moser, R., and Tavares-de-Lima, W. (2010) Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway, *Med Microbiol Immunol* 199, 35-42.
  512. Santos-Sierra, S., Deshmukh, S. D., Kalnitski, J., Kuenzi, P., Wymann, M. P., Golenbock, D. T., and Henneke, P. (2009) Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization, *EMBO J* 28, 2018-2027.
  513. Deitch, E. A., Adams, C., Lu, Q., and Xu, D. Z. (2001) A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability, *Surgery* 129, 39-47.
  514. Lu, Q., Xu, D. Z., Davidson, M. T., Hasko, G., and Deitch, E. A. (2004) Hemorrhagic shock induces endothelial cell apoptosis, which is mediated by factors contained in mesenteric lymph, *Crit Care Med* 32, 2464-2470.
  515. Senthil, M., Watkins, A., Barlos, D., Xu, D. Z., Lu, Q., Abungu, B., Caputo, F., Feinman, R., and Deitch, E. A. (2007) Intravenous injection of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph causes lung injury that is dependent upon activation of the inducible nitric oxide synthase pathway, *Ann Surg* 246, 822-830.
  516. Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. v., and Tessier, P. A. (2003) Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion, *The Journal of Immunology* 170, 3233-3242.
  517. Roth, J., Vogl, T., Sorg, C., and Sunderkotter, C. (2003) Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules, *Trends Immunol* 24, 155-158.
  518. Manitz, M. P., Horst, B., Seeliger, S., Strey, A., Skryabin, B. V., Gunzer, M., Frings, W., Schonlau, F., Roth, J., Sorg, C., and Nacken, W. (2003) Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface

- expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro, *Mol Cell Biol* 23, 1034-1043.
519. Gil, S., Farnand, A. W., Altemeier, W. A., Gill, S. E., Kurdowska, A., Krupa, A., Florence, J. M., and Matute-Bello, G. (2012) Fas-deficient mice have impaired alveolar neutrophil recruitment and decreased expression of anti-KC autoantibody:KC complexes in a model of acute lung injury, *Respir Res* 13, 91.
520. Konrad, F. M., and Reutershan, J. (2012) CXCR2 in acute lung injury, *Mediators Inflamm* 2012, Article ID 740987.
521. Burdon, P. C., Martin, C., and Rankin, S. M. (2005) The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner, *Blood* 105, 2543-2548.
522. Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., McClain, J., Sherry, B., Fabre, M., van Deventer, S., and Cerami, A. (1990) Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues, *J Exp Med* 172, 911-919.
523. Olson, T. S., and Ley, K. (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, 7-28.
524. Reutershan, J., Morris, M. A., Burcin, T. L., Smith, D. F., Chang, D., Saprito, M. S., and Ley, K. (2006) Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung, *J Clin Invest* 116, 695-702.
525. Ahuja, S. K., Lee, J. C., and Murphy, P. M. (1996) CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct, *J Biol Chem* 271, 225-232.
526. Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C., and Wood, W. I. (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor, *Science* 253, 1278-1280.
527. Russo, R. C., Guabiraba, R., Garcia, C. C., Barcelos, L. S., Roffe, E., Souza, A. L., Amaral, F. A., Cisalpino, D., Cassali, G. D., Doni, A., Bertini, R., and Teixeira, M. M. (2009) Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 410-421.
528. Call, D. R., Nemzek, J. A., Ebong, S. J., Bolgos, G. R., Newcomb, D. E., Wollenberg, G. K., and Remick, D. G. (2001) Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2, *Shock* 15, 278-284.
529. Becker, S., Quay, J., Koren, H. S., and Haskill, J. S. (1994) Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages, *Am J Physiol* 266, 278-286.
530. Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grail, D., Ernst, M., Jones, S. A., Topley, N., and Jenkins, B. J. (2008) IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3, *J Immunol* 181, 2189-2195.
531. Barriere, S. L., and Lowry, S. F. (1995) An overview of mortality risk prediction in sepsis, *Crit Care Med* 23, 376-393.
532. Nast-Kolb, D., Waydhas, C., Gippner-Steppert, C., Schneider, I., Trupka, A., Ruchholtz, S., Zetl, R., Schweiberer, L., and Jochum, M. (1997) Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries, *J Trauma* 42, 446-454.

533. Donnelly, T. J., Meade, P., Jagels, M., Cryer, H. G., Law, M. M., Hugli, T. E., Shoemaker, W. C., and Abraham, E. (1994) Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury, *Crit Care Med* 22, 768-776.
534. Gebhard F, P. H. S. G. S. W. K. L. B. c. U. B. (2000) IS interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?, *Archives of Surgery* 135, 291-295.
535. Giannoudis, P. V., Smith, M. R., Evans, R. T., Bellamy, M. C., and Guillou, P. J. (1998) Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients, *Acta Orthop Scand* 69, 184-188.
536. Jones, S. A. (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6, *J Immunol* 175, 3463-3468.
537. McLoughlin, R. M., Witowski, J., Robson, R. L., Wilkinson, T. S., Hurst, S. M., Williams, A. S., Williams, J. D., Rose-John, S., Jones, S. A., and Topley, N. (2003) Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation, *J Clin Invest* 112, 598-607.
538. Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N., and Jones, S. A. (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation, *Immunity* 14, 705-714.
539. McLoughlin, R. M., Jenkins, B. J., Grail, D., Williams, A. S., Fielding, C. A., Parker, C. R., Ernst, M., Topley, N., and Jones, S. A. (2005) IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9589-9594.
540. Christou, N. V., Meakins, J. L., Gordon, J., Yee, J., Hassan-Zahraee, M., Nohr, C. W., Shizgal, H. M., and MacLean, L. D. (1995) The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later, *Ann Surg* 222, 534-546.
541. Livingston, D. H., Appel, S. H., Wellhausen, S. R., Sonnenfeld, G., and Polk, H. C., Jr. (1988) Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury, *Arch Surg* 123, 1309-1312.
542. Kinnaert, P., Mahieu, A., Mahieu, M., and Van Geertruyden, N. (1983) Effect of surgical trauma on delayed type hypersensitivity, *J Surg Res* 34, 227-230.
543. Abraham, E., and Chang, Y. H. (1992) Haemorrhage-induced alterations in function and cytokine production of T cells and T cell subpopulations, *Clin Exp Immunol* 90, 497-502.
544. Polk, H. C., Jr., Cheadle, W. G., Livingston, D. H., Rodriguez, J. L., Starko, K. M., Izu, A. E., Jaffe, H. S., and Sonnenfeld, G. (1992) A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients, *Am J Surg* 163, 191-196.
545. Spruijt, N. E., Visser, T., and Leenen, L. P. (2010) A systematic review of randomized controlled trials exploring the effect of immunomodulative interventions on infection, organ failure, and mortality in trauma patients, *Crit Care* 14, 150.
546. Tominaga, K., Yoshimoto, T., Torigoe, K., Kurimoto, M., Matsui, K., Hada, T., Okamura, H., and Nakanishi, K. (2000) IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells, *Int Immunol* 12, 151-160.

547. Reynolds, C. W., Timonen, T., and Herberman, R. B. (1981) Natural killer (NK) cell activity in the rat. I. Isolation and characterization of the effector cells, *J Immunol* 127, 282-287.
548. Weissman, D. N., deShazo, R. D., and Banks, D. E. (1986) Modulation of natural killer cell function by human alveolar macrophages, *J Allergy Clin Immunol* 78, 571-577.
549. Hirsh, M., Kaplan, V., Dyugovskaya, L., and Krausz, M. M. (2004) Response of lung NK1.1-positive natural killer cells to experimental sepsis in mice, *Shock* 22, 40-45.
550. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., de Oliveira, R. B., Golenbock, D., Fitzgerald, K., Shalova, I. N., Biswas, S. K., Cavillon, J. M., and Adib-Conquy, M. (2013) Interferon-gamma and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor production by natural killer cells involves different signaling pathways and the adaptor stimulator of interferon genes (STING), *J Biol Chem* 288, 10715-10721.
551. Bonfield, T. L., Konstan, M. W., Burfeind, P., Panuska, J. R., Hilliard, J. B., and Berger, M. (1995) Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 257-261.
552. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
553. Fernandez, S., Jose, P., Avdiushko, M. G., Kaplan, A. M., and Cohen, D. A. (2004) Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists, *J Immunol* 172, 2613-2620.
554. Hazlett, L. D., Rudner, X. L., McClellan, S. A., Barrett, R. P., and Lighvani, S. (2002) Role of IL-12 and IFN-gamma in *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 419-424.
555. D'Ambrosio, D., Mariani, M., Panina-Bordignon, P., and Sinigaglia, F. (2001) Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation, *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1266-1275.
556. Cullen, K. L., Dickey, J. P., Bent, L. R., Thomason, J. J., and Moens, N. M. (2013) Internet-based survey of the nature and perceived causes of injury to dogs participating in agility training and competition events, *J Am Vet Med Assoc* 243, 1010-1018.
557. Fossum, T. W. (2011) *Chirurgie der Kleintiere*, Urban & Fischer Verlag.
558. Slatter, D. H. (2003) *Textbook of Small Animal Surgery* Saunders (W.B.) Co Ltd, Philadelphia.
559. Lethvall, S., Lindgren, S., Lundin, S., and Stenqvist, O. (2004) Tracheal double-lumen ventilation attenuates hypercapnia and respiratory acidosis in lung injured pigs, *Intensive Care Med* 30, 686-692.
560. Thomovsky, E. J., and Bach, J. (2014) Incidence of acute lung injury in dogs receiving transfusions, *J Am Vet Med Assoc* 244, 170-174.
561. Yang, Y., Chen, Q., Liu, S., Huang, Y., Liu, L., Wu, X., Chen, G., Jin, J., Teng, G., and Qiu, H. (2014) Effects of recruitment maneuvers with PEEP on lung volume distribution in canine models of direct and indirect lung injury, *Mol Biol Rep*.

## 10 ANHANG

## 10.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1 Überblick der immunologischen Abwehr. ....	4
Abb. 2.2 DC- Reifung nach Antigenkontakt. ....	8
Abb. 2.3 Aktivierung von T <sub>H</sub> - Zellen. ....	9
Abb. 2.4 Interaktion zwischen NK- Zellen und DCs. ....	10
Abb. 2.5 Diapedese von Granulozyten aus dem Gefäßlumen in Entzündungsgewebe. .....	12
Abb. 2.6 Antimikrobille Mechanismen von neutrophilen Granulozyten. ....	14
Abb. 2.7 Differenzierung von B- Zellen. ....	16
Abb. 2.8 Differenzierung von naiven CD4 <sup>+</sup> - T- Zellen nach Antigenpräsentation durch APCs in verschiedene Effektorzellen. ....	18
Abb. 2.9 Antigenkontakt und Induktion der Immunantwort in der Lunge. ....	21
Abb. 2.10 Intakte Alveole und geschädigte Alveole während der akuten Phase des ARDS. ....	28
Abb. 4.1 Induktion eines geschlossenen Weichteiltraumas. ....	40
Abb. 4.2 Prinzip der Durchflusszytometrie. ....	49
Abb. 4.3 Lichtstreuungs- Eigenschaften einer Zelle. ....	50
Abb. 4.4 Schematische Darstellung des Prinzip des Sandwich- ELISA. ....	54
Abb. 4.5 Beispielhafte Darstellung des Versuchsablaufs eines drei- Stunden- Traumas. ....	56
Abb. 4.6 Versuchsablauf mit Serumtransfer. ....	57
Abb. 4.7 Versuchsablauf im Infektionsmodell. ....	58

Abb. 5.1 (modifizierte Abb. 4.5) Versuchsaufbau Induktion eines Weichteiltraumas.	60
Abb. 5.2 Durchflusszytometrische Messung von Granulozyten in der Lunge.....	61
Abb. 5.3 Zeitkinetik zur Granulozytenanzahl in der Lunge und CD11b- Expression der Granulozyten. ....	62
Abb. 5.4 Durchflusszytometrische Darstellung der gemessenen Granulozyten im Blut. ....	63
Abb. 5.5 Prozentualer Anteil an Granulozyten im Blut nach Trauma.....	64
Abb. 5.6 Durchflusszytometrische Analyse von Granulozyten in der Milz. ....	65
Abb. 5.7 Monozyten und Makrophagen in der Lunge nach Trauma.....	66
Abb. 5.8 Beobachtung von NKT-, CD3 <sup>+</sup> - T- und NK- Zellen nach Trauma in der Lung .....	68
Abb. 5.9 Durchflusszytometrische Messung von CD11c <sup>+</sup> MHC Klasse II <sup>+</sup> - DCs in der Lunge.....	69
Abb. 5.10 Unveränderte Anzahl an DCs in der Lunge nach Trauma.....	70
Abb. 5.11 Unterschiedliche Granulozyteninfiltration in die Lunge von TLR4 <sup>-/-</sup> - und TLR2,4 <sup>-/-</sup> - Mäusen drei Stunden nach Trauma. ....	71
Abb. 5.12 Granulozytenmuster der Lunge drei Stunden nach Trauma in MyD88 <sup>-/-</sup> - Mäusen. ....	72
Abb. 5.13 ROS- Produktion der Granulozyten drei Stunden nach Trauma. ....	74
Abb. 5.14 Erhöhte S100A8/ S100S9- Protein- Konzentration im Serum zeitgleich mit der Granulozyteninfiltration. ....	75
Abb. 5.15 (modifizierte Abb. 4.6) Versuchsaufbau Serumtransfer.....	76
Abb. 5.16 Transferierte Granulozyteninfiltration in die Lungen von naiven Tieren. ...	77
Abb. 5.17 (modifizierte Abb. 4.7) Versuchsaufbau des Lungeninfektionsmodell.....	78

Abb. 5.18 Granulozyteninfiltration in die Lunge nach Trauma und Sekundärinfektion mit <i>P. aeruginosa</i> .....	80
Abb. 5.19 Anzahl an Monozyten und Makrophagen in der Lunge nach Trauma und <i>Pseudomonas</i> - Infektion. ....	82
Abb. 5.20 Anzahl an NKT-, CD3 <sup>+</sup> - T- und NK- Zellen in der Lunge nach Trauma und <i>Pseudomonas</i> - Infektion. ....	84
Abb. 5.21 Anzahl an DCs in der Lunge nach Trauma und <i>Pseudomonas</i> - Infektion.	85
Abb. 5.22 (modifizierte Abb. 4.5) Analyse der Zytokinkonzentration mittels ELISA nach Zellkultivierung. ....	86
Abb. 5.23 Chemokinmuster kultivierter Lungenzellen.....	87
Abb. 5.24 Zytokinmuster kultivierter Lungenzellen. ....	88
Abb. 5.25 Steigerung der ROS- Produktion mit Anstieg der Granulozytenzahl nach <i>Pseudomonas</i> - Infektion. ....	89

## 10.2 TABELLENVERZEICHNIS

---

Tab. 3.1 Verwendete Geräte.....	32
Tab. 3.2 Puffer und Lösungen.....	33
Tab. 3.3 Reagenzien und Stimuli .....	34
Tab. 3.4 Antikörper.....	36
Tab. 3.5 ELISA- Test- Kits .....	37
Tab. 4.1 Verwendete Fluoreszenzstoffe .....	51