

Der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) und seine
Liganden in der systemischen Entzündungsreaktion nach Polytrauma

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Florian Uhle
aus Karlsruhe

Gießen 2014

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Markus A. Weigand) des Zentrums für
Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie (Sprecher: Prof. Dr. W. Padberg)

- Dekan:** **Prof. Dr. Trinad Chakraborty**
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
- 1. Gutachter:** **Prof. Dr. Markus A. Weigand**
Klinik für Anästhesie, Operative
Intensivmedizin und Schmerztherapie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2. Gutachter:** **Prof. Dr. Michael Niepmann**
Biochemisches Institut
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 19.12.2014

Für Jonas und Noah

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Inflammation – eine multidimensionale Entität	1
1.1.1. Allgemeines und Definition	1
1.1.2. DAMPs und PAMPs – unterschiedliche Quellen, gleiche Wirkung	3
1.1.3. Die systemische Inflammation – SIRS und CARS	8
1.2. Das Polytrauma	9
1.2.1. Definition, Prävalenz und Ursachen	9
1.2.2. Therapie	10
1.2.3. Pathophysiologie des Polytraumas	11
1.3. Der <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> (RAGE)	13
1.3.1. Genetik, Regulation und Struktur	13
1.3.2. Die Liganden und Signaltransduktion	15
1.3.3. Relevanz bei inflammatorischen Erkrankungen	17
1.4. Fragestellung	19
2. Material	20
2.1. Software	20
2.2. Geräte	20
2.3. Oligonukleotide und Sonden	21
2.4. Kits	21
2.5. Chemikalien	22
2.6. Verbrauchsmaterial	22
2.7. Zellkultur	23
2.8. Antikörper	23
2.9. ELISA	23
3. Methoden	24
3.1. Studiendesign	24
3.1.1. Studie 1: Retrospektive Biobankkohorte	24
3.1.2. Studie 2: RiSaP – RAGE in Sepsis after Polytraumatization	25
3.2. Zellkultur	28
3.2.1. Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen	28
3.2.2. Gewinnung und Kultivierung primärer Monozyten	28
3.2.2.1. Vom Vollblut zu PBMCs	28
3.2.2.2. Isolation von Monozyten mittels Adhärenz	29
3.2.2.3. Isolation von Monozyten mittels negativer Bead-Selektion	30
3.2.3. Quantifizierung der Zellen	31
3.2.4. Doppelstimulationsexperimente	32
3.3. Genexpressionsanalyse mit PCR	33
3.3.1. Isolation von RNA	33
3.3.2. Quantifizierung mittels NanoDrop™	33
3.3.3. Reverse Transkription	34
3.3.4. Endpunkt-PCR	34
3.3.5. Realtime-PCR	36
3.3.6. qPCR-Array	37
3.4. Durchflusszytometrie	38
3.4.1. Quantitative Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten	38
3.4.2. Quantitative Bestimmung der Proteinexpression	39
3.4.3. Messung von Oberflächenmarkern	40
3.4.4. intrazelluläre Färbung von TNF- α	41
3.4.5. Analyse des Zellzyklus	42
3.4.6. Erfassung der Apoptose- und Nekroserate	43
3.4.7. Qualitätskontrolle der Monozytenisolation	44
3.4.8. Zytokinbestimmung mittels <i>Cytometric Bead Array</i>	45

3.5. ELISA	46
3.6. Qualitativer Nachweis von Zytokinen mittels Membran-basiertem Proteinarray	47
3.7. Statistik	48
4. Ergebnisse	50
4.1. Retrospektive Analyse von plasmatischen RAGE-Isoformen in einer Biobankkohorte von Traumapatienten	50
4.1.1. Demographie der Kohorte	50
4.1.2. Zeitlicher Verlauf der RAGE- und IL-6- Konzentrationen nach schwerem Trauma	51
4.1.3. Zeitlicher Verlauf der RAGE-Konzentrationen im Vergleich zwischen Überlebenden und Nicht-Überlebenden	52
4.1.4. Zeitlicher Verlauf der RAGE- und IL-6 Konzentrationen gruppiert nach Verletzungsschwere	53
4.1.5. Korrelation der RAGE-Isoformen untereinander und mit IL-6	54
4.1.6. RAGE- und IL-6- Konzentrationen unmittelbar nach Trauma im Vergleich von Patienten mit und ohne Thoraxverletzung	55
4.1.7. Die RAGE-Isoformen als Marker für ALI und ARDS	56
4.2. RiSaP – eine prospektive Beobachtungsstudie zur Untersuchung von RAGE nach Polytrauma	57
4.2.1. Beschreibung des Untersuchungskollektivs	57
4.2.2. Verlauf klinischer Routineparameter nach Polytrauma	58
4.2.3. Kinetik der RAGE-Isoformen und IL-6 nach Trauma	59
4.2.4. Expression von RAGE auf Monozyten im Verlauf nach Polytrauma	61
4.2.5. Kinetik der RAGE-Liganden im Verlauf nach Polytrauma	62
4.3. Konsequenz der Aktivierung der AGE-RAGE-Achse – <i>in vitro</i>	66
4.3.1. Charakterisierung der Zelllinie MonoMac-6	66
4.3.2. Initiales Screening zum Einfluss des Primings mit verschiedenen PRR-Liganden auf die sekundäre Reaktionsfähigkeit	69
4.3.3. Verifizierung der Ergebnisse des Screenings	70
4.3.4. Die AGE-induzierte Selbst- und Kreuztoleranz ist dosisabhängig und nicht beschränkt auf die Sekretion von TNF- α	71
4.3.5. Stimulation mit AGE-BSA oder LPS fördert weder Zelltodprozesse noch moduliert sie den Zellzyklus	73
4.3.6. Analyse der Genexpression relevanter Faktoren nach Stimulation	75
4.3.7. Toleranz ist assoziiert mit einer reduzierten intrazellulären Konzentration an TNF- α nach erneuter Stimulation	77
4.3.8. Nachweis der Toleranzinduktion in primären human Monozyten	78
5. Diskussion	80
5.1. Die löslichen Isoformen von RAGE nach Trauma	80
5.2. Die AGE-RAGE-Achse nach Polytrauma	84
5.3. AGEs induzieren eine <i>metabolic immune tolerance</i>	87
5.4. Schlussfolgerung und Ausblick	91
6. Zusammenfassung	92
7. Summary	93
8. Abkürzungsverzeichnis	94
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
9.1. Abbildungen	95
9.2. Tabellen	96
10. Literaturverzeichnis	97

11. Anhang.....	110
12. Publikationsverzeichnis	111
12.1. Veröffentlichungen dieser Arbeit.....	111
12.2. Sonstige Publikationen (<i>peer-reviewed</i>)	111
13. Ehrenwörtliche Erklärung	113
14. Danksagung.....	114
15. Tabellarischer Lebenslauf.....	115

1. Einleitung

1.1. Inflammation – eine multidimensionale Entität

1.1.1. Allgemeines und Definition

Der Begriff Inflammation leitet sich vom lateinischen Wort *inflammō* ab, was soviel bedeutet wie „entzünden“ oder „in Flammen stehen“. Damit trägt der Begriff den fünf Kardinalsymptomen (nach Celsus und Galen) jedes entzündlichen Prozesses Rechnung:

<i>dolor</i>	Schmerz
<i>calor</i>	Wärme
<i>rubor</i>	Rötung
<i>tumor</i>	Schwellung
<i>functio laesa</i>	Funktionsverlust

Hervorgerufen wird die Symptomatik durch eine Reaktion des Immunsystems auf eindringende Mikroorganismen oder geschädigte Körperzellen die das Ziel hat, die Bedrohung zu beseitigen, die Integrität des Körpers wiederherzustellen und damit die Homöostase zu stabilisieren.

Inflammation ist dabei der Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe an Zuständen, die durch verschiedene Qualitäten charakterisiert werden können. Neben der Frage nach der Eigenschaft des ursächlichen Stimulus (steril vs. septisch) ist dabei sowohl die zeitliche (akut vs. chronisch) als auch die örtliche (lokal vs. systemisch) Dimension von entscheidender Bedeutung (Abb.1).

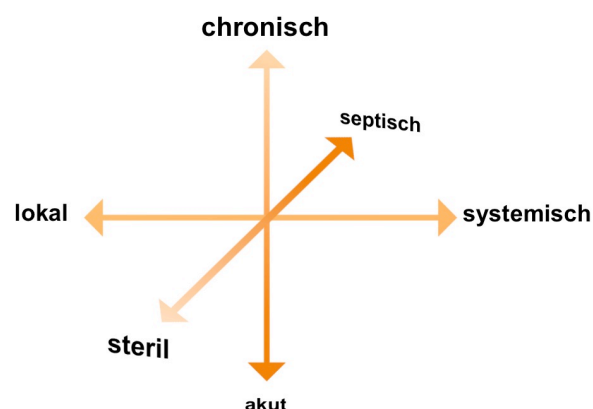


Abbildung 1: Schematische Darstellung der qualitativen Dimensionen der Inflammation.

Prinzipiell kann ein inflammatorischer Prozess jede beliebige Kombination der oben genannten Eigenschaften annehmen, ist jedoch vor allem plastisch und kann im

Verlauf der Erkrankung grundlegenden Veränderungen unterworfen sein. Beispielhaft sei hier eine offene traumatische Unterschenkelfraktur angeführt. Durch die Schädigung der verschiedenen Gewebe, angefangen von der äußersten Hautschicht – der Epidermis – bis hin zur Knochensubstanz kommt es zur Freisetzung von endogenen Zellbestandteilen (1), die als sogenannten *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPs) in der Lage sind, die Zellen des Immunsystems über konservierte Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors* – PRR) zu aktivieren (2). Die resultierende Immunreaktion trägt dazu bei, den vorhandenen Schaden einzudämmen und körpereigene Reparaturmechanismen zu starten. Dabei steht das angeborene Immunsystem im Mittelpunkt des Geschehens. Mit seinen diversen Zelltypen stellt es die erste Verteidigungslinie des Organismus dar. Seine Zellen sind dabei sowohl Sensoren als auch Effektoren der Immunreaktion, allen voran die Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Zu dieser Gruppe zählen unter anderem Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritischen Zellen. Nach Aktivierung produzieren diese Zellen Zytokine und Chemokine, wandern in das betroffene Gewebe aus und phagozytieren dort zerstörte Körperzellen oder Mikroorganismen. Sofern es sich um körperfremde Mikroorganismen handelt, werden durch die APC Antigenfragmente der Mikroorganismen nach lysosomalem Verdau mittels des *Major Histocompatibility Complex* Klasse II (MHC II) auf der Zelloberfläche präsentiert, was der weiteren Aktivierung des adaptiven Immunsystems, maßgeblich der naiven CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen, dient. Die Ausschüttung diverser Botenstoffe bewirkt sowohl eine Aktivierung weiterer Immunzellen als auch eine autokrine Selbststimulation. Durch das enge Zusammenspiel zwischen Immun- und Gerinnungssystem kommt es im Bereich der Irritation zu einer Aktivierung des Letzteren, um eine Abschottung des betroffenen Gebietes zur Eindämmung der Entzündung und gegebenenfalls Infektion zu erreichen (3).

Die oben beschriebene Verletzung führt somit initial zu einer akuten, lokalen und sterilen Entzündungsreaktion. Kommt es durch den Verlust der äußeren Körperbarrieren zu einem Eindringen von Mikroorganismen in den Wundbereich, so werden auch diese von den PRRs der Immunzellen anhand von *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) auf der Oberfläche der Mikroorganismen detektiert. Ist der Körper nachfolgend aufgrund des Ausmaßes der Verletzung oder sonstiger Störungen des Immunsystems nicht in der Lage die Infektion einzudämmen, kommt es zu einer systemischen Disseminierung der Mikroorganismen oder deren Bestandteile. Wird dadurch eine systemische Aktivierung des Immunsystems ausgelöst, so bezeichnet man diese Reaktion als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Bei

Vorhandensein einer zugrundeliegenden Infektion wie im hier genannten Beispiel spricht man dann definitionsgemäß von einer Sepsis (4).

Im folgenden Abschnitt sollen die Initiatoren der Immunantwort – die DAMPs und PAMPs – sowie deren Wirkungen auf molekularer Ebene beleuchtet werden.

1.1.2. DAMPs und PAMPs – unterschiedliche Quellen, gleiche Wirkung

Der Organismus muss in der Lage sein, Gefahr sowohl von innen als auch von außen zu erkennen und darauf zu reagieren. Neben den Signalmolekülen selbst müssen daher entsprechende Rezeptoren auf Effektorzellen vorhanden sein, um diese zu erkennen. Zudem müssen diese Zellen in der Lage sein, adäquat auf die Erkennung der Gefahr zu reagieren und diese zu beseitigen.

Als Signalmoleküle der ersten Verteidigungslinie – des angeborenen Immunsystems – fungieren die oben schon erwähnten PAMPs und DAMPs. Bei den PAMPs handelt es sich überwiegend um strukturelle Bestandteile der Zellmembran bzw. –wand von Bakterien oder Pilzen. Zu den klassischen Vertretern zählen dabei das Lipopolysachharid (LPS) aus der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien und das Zymosan, ein Polymer aus β -1,3-verknüpften Glukosemolekülen, welches in der Zellwand verschiedener Hefepilze (z.B. dem opportunistisch humanpathogenen *Candida albicans*) vorkommt. Neben diesen Strukturmolekülen wurden mittlerweile auch verschiedene Nukleinsäuren als PAMPs charakterisiert. Einzelsträngige und doppelsträngige RNA-Stränge viralen Ursprungs sind in der Lage von Immunzellen erkannt zu werden. Bakterielle und eukaryotische Genome unterscheiden sich neben der Größe und der Organisation der Chromosomen auch in der statistischen Verteilung sogenannter Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpG), die im bakteriellen Genom im Vergleich zum Genom von höheren Eukaryoten überrepräsentiert sind. Beide DNA-Spezies sind in der Lage das Immunsystem zu aktivieren, man geht aber heute davon aus, dass eine Diskriminierung zwischen „fremd“ und „selbst“ durch die Verwendung verschiedener Rezeptoren und die Integration verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden erfolgt. Neueste Untersuchungen zeigen zudem, dass „fremd“ auch dem Zellinneren entstammen kann. Die Entstehung der Mitochondrien (und anderer Zellorganellen) wird heute mit der Endosymbiontentheorie erklärt (5). Diese postuliert, dass die Mitochondrien durch Aufnahme von Proteobakterien in eine eukaryontische Zelle entstanden sind. Im Laufe der Zeit wurde nicht benötigtes genetisches Material reduziert, dennoch besitzen die Mitochondrien noch heute ein eigenes Genom, welches sich durch seinen Anteil an CpG-Dinukleotiden vom Genom der Zelle unterscheidet. Eine Freisetzung der mitochondrialen DNA (mtDNA) resultiert in einer

starken Immunreaktion des Organismus (6). Nukleinsäuren stehen somit auf der Grenze zwischen DAMPs und PAMPs. Daneben wurde bislang eine Reihe weiterer Zellbestandteile beschrieben, die eine Wirkung als DAMP zeigen. Die alte Bezeichnung „Alarmin“ wurde im Zuge des wachsenden Interesses an den endogenen Alarmmolekülen an den schon etablierten Begriff der PAMPs angepasst, wenngleich der alte Name die Funktion der Moleküle umfassend widerspiegelt (7). Um als universelles DAMP wirken zu können, muss das Molekül

- 1.) in allen Zellen des Organismus vorkommen,
- 2.) bei einem nicht-apoptotischen Zelluntergang zuverlässig freigesetzt werden,
- 3.) intrazellulär in so großen Mengen vorhanden sein, dass auch der Untergang weniger Zellen ausreicht, um eine Reaktion auszulösen und
- 4.) in der Lage sein, Rezeptoren des Immunsystems zu stimulieren

Eine große Gruppe der Alarmine ist proteinerger Natur. Dazu zählt die heterogene Gruppe der S100-Proteine. Dabei handelt es sich um cytoplasmatische, calciumbindende Proteine mit einer großen Funktionsvielfalt (8). Zahlreiche Vertreter der Familie binden nachweislich, jedoch mit unterschiedlichsten Kinetiken an RAGE (darunter S100B sowie S100A8, A9 und A12). Neben den oben beschriebenen Nukleinsäuren RNA und DNA wirken auch die im Nukleus vorhandenen Proteine nachweislich als DAMPs. Zu den Molekülen mit der höchsten Abundanz in der Zelle zählen die Histonuntereinheiten, die originär für die Organisation des Chromatins und der Regulation der Genexpression eng mit der genomischen DNA assoziiert sind, bei einer Freisetzung jedoch eine starke Immunreaktion auslösen können (9). Darüber hinaus sind die Histone auch integrale Bestandteile der *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), netzartige Gebilde aus Chromatin und verschiedenen Enzymen wie Myeloperoxidasen und Elastasen, die in einem aktiven Zelltodprozess – der NETose – von neutrophilen Granulozyten ausgestoßen werden und eine physikalische Barriere in den Blutgefäßen und geschädigten Geweben bilden. Man geht davon aus, dass die NETs eine grundlegende Relevanz bei der Eindämmung der Infektion besitzen (10). Interessanterweise stellen die NETs nicht nur eine passive Barriere dar, sie wirken auch bakteriolytisch durch die assoziierten Proteine (11). Das wohl bekannteste DAMP der proteinergeren Gruppe – das *High Mobility Group Protein B1* (HMGB1) – entstammt ebenfalls dem Zellkern, wo es die Konformation des Chromatins moduliert und damit die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderer regulatorischer Proteine an die DNA unterstützt (12). Eine Besonderheit des HMGB1 ist seine duale Funktion. Es kann durch einen aktiven Prozess von Makrophagen als Reaktion auf inflammatorische

Stimuli sezerniert werden (13), wird aber auch klassisch als DAMP bei einem nekrotischen Zelltod freigesetzt (14). Zudem unterliegt es in Abhängigkeit des extrazellulären Redoxmilieus einer Konformationsänderung, die seine Funktion maßgeblich beeinflusst. So kann es sowohl als „Lockmittel“ für Immunzellen (Chemokin) als auch als klassisches Zytokin wirken (15). Ob die letztgenannte Funktion allein von HMGB1 ohne die Anwesenheit von zusätzlichen Kofaktoren funktioniert, darüber besteht eine kontroverse Diskussion mit uneinheitlicher Literaturlbasis. Eine Vielzahl von Publikationen weisen in die Richtung, dass HMGB1 als „Trägermolekül“ im Komplex mit anderen PAMPs (z.B. DNA und LPS) und auch Zytokinen (z.B. IL- β) agiert und unter Nutzung verschiedener Immunrezeptoren die zelluläre Reaktion synergistisch unterstützt (16).

Eine weitere Gruppe der DAMPs setzt sich aus Stoffwechselprodukten zusammen. Dazu zählt Harnsäure, aber auch Produkte des Purinstoffwechsels wie dem universellen Energieträger der Zelle – das ATP (17, 18). Darüber hinaus existieren Stoffwechselprodukte, die in Zuständen zellulären Stresses gebildet werden und die indirekt über sekundäre Moleküle als DAMPs agieren. Dazu zählt das Methylglyoxal, eine stark radikalisch wirkende Dicarbonylverbindung, welche extrazellulär unter Reaktion mit Proteinen oder Lipiden zur Bildung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) führt (19). AGEs entstehen jedoch auch unabhängig von Methylglyoxal bei hohem oxidativem Stress oder hoher Zuckerverfügbarkeit.

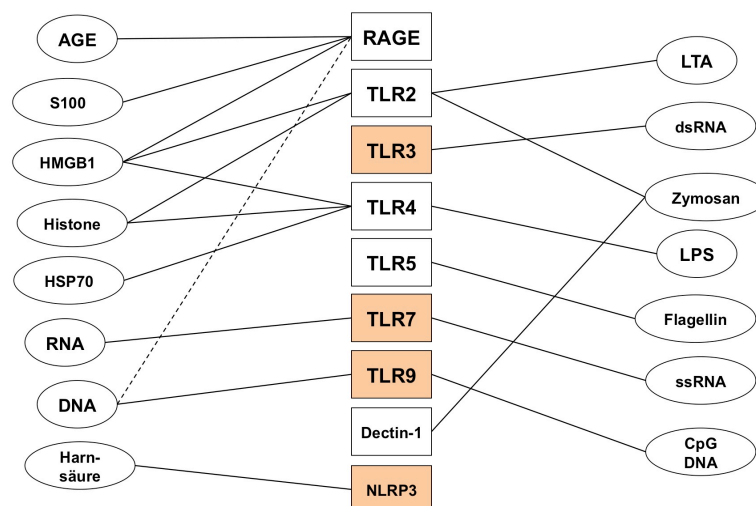


Abbildung 2: Ausgewählte DAMPs und PAMPs und ihre zugehörigen PRRs. Linke Spalte: DAMPs, rechte Seite: PAMPs, mittlere Achse: PRRs. Durchgezogene Linien zeigen bekannte Interaktion. Orangene Rechtecke zeigen intrazelluläre Lokalisation. AGE: *Advanced Glycation Endproducts*, TLR: *Toll-like* Rezeptoren, HSP70: *Heat Shock Protein 70*, LTA: Lipoteichonsäure, dsRNA: doppelsträngige RNA, ssRNA: einzelsträngige RNA

Jedes Signal benötigt einen Rezeptor, der dieses empfängt und weiterleitet. Für die

oben beschriebenen DAMPs und PAMPs sind dies die PRRs – die Mustererkennungsrezeptoren. Diese werden von Zellen des Immunsystems, jedoch auch nachgewiesenermaßen auf Endothel- und Epithelzellen exprimiert und sind entweder auf der Zelloberfläche (z.B. TLR2 und RAGE), intrazellulär in Zellkompartimenten wie den Endosomen (TLRs 3 und 9) oder im Zytoplasma (RIG-I) (2). Zur bekanntesten Gruppe der PRRs zählen die *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Ursprünglich wurden die Rezeptoren dieser Gruppe in *Drosophila melanogaster* entdeckt, später wurden homologe Strukturen in nahezu allen tierischen Organismen gefunden. Mittlerweile sind im Menschen 10 TLRs bekannt (Maus: 12 TLRs), die ein breites Spektrum von evolutiv konservierten Mustern erkennen können. Eine Reihe der Rezeptoren sind in der Lage, mehr als nur einen Liganden zu erkennen und im Gegenzug binden verschiedene Liganden mehr als nur einen Rezeptor (Abb. 2). Als Konsequenz der Ligandenbindung kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die im Falle der TLRs extensiv erforscht sind (20). TLRs nutzen grundsätzlich zwei verschiedene Signalwege: den *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MYD88)-unabhängigen und abhängigen Signalweg. Welcher davon aktiviert wird hängt vom Rezeptor, aber auch von der Lokalisation, dem Liganden und dem Zelltyp ab. So leitet der intrazellulär in Endosomen lokalisierte TLR3 sein Signal nach Ligandenbindung ausschließlich über den MYD88-unabhängigen Signalweg unter Nutzung des Adapterproteins TRIF weiter. Im Gegensatz dazu ist der LPS-bindende TLR4 in der Lage, beide Signalwege mit zeitlicher Verzögerung zu aktivieren und kann damit eine biphasische Reaktion der Zelle bewirken. Die Lokalisation des Rezeptors ist hier von entscheidender Bedeutung: TLR4 auf der Plasmamembran aktiviert den MYD88-abhängigen Weg bis hin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- κ B), während endosomal lokalisierter TLR4 den MYD88-unabhängigen Weg aktiviert, der neben NF- κ B auch zu einer Aktivierung des *Interferon Regulatory Factors 3* (IRF3) führt. Die subzelluläre Lokalisierung wird dabei durch die Zelle selbst gesteuert und moduliert damit die Reaktion, die anfänglich zu einer Aktivierung der Expression pro-inflammatorischer Gene (z.B. die Zytokine TNF- α , IL-6) führt, sekundär jedoch stets auch eine Gegenregulation in Form der Expression von anti-inflammatorischen Genen (z.B. das Zytokin IL-10 oder regulatorischer miRNAs) bewirkt (21). Diese Form der negativen Rückkopplung ist ein elementarer Bestandteil der Reaktion, um eine überschießende Reaktion und damit eine Schädigung des Organismus selbst zu vermeiden.

Neben den beschriebenen TLRs gibt es eine Reihe weiterer Rezeptoren, die zur Gruppe der PRRs zählen. Dectin-1 ist ein membranständiger Rezeptor, der im Zusammenspiel mit dem TLR2 Zellwandbestandteile von Pilzen erkennt und

maßgeblich an der antifungalen Immunität beteiligt ist (22). Neben den intrazellulären TLRs existieren zudem die zytoplasmatischen *RIG-I-like* Rezeptoren (RLR), die eine hohe Relevanz bei der antiviralen Erkennung von Nukleinsäuren besitzen (23). RIG-I ist sogar in der Lage, virale von zelleigenen Nukleinsäuren zu unterscheiden und ermöglicht damit eine spezifische Immunreaktion bei einer intrazellulären Infektion (24). Eine besondere zytoplasmatische Struktur stellt das Inflammasom dar. Dabei handelt es sich um eine Familie heterogener und oligomerer Proteinkomplexe, die mindestens aus einem NOD-like Rezeptorprotein (z.B. NLRP3 oder IPAF) und einer Caspase (-1 oder -11) zusammengesetzt sind. Oftmals sind Rezeptor und Caspase über die Pyrin-Domäne (PYD) und die *Caspase Recruitment*-Domäne des Adaptorproteins ASC verbunden. Eine Aktivierung durch Stimuli wie ATP oder Harnsäure führt zu einer Caspase-abhängigen Spaltung von Vorläufermolekülen in reife Zytokine (IL-1 β , IL-18). (25). Allen PRRs ist gemein, dass sie ein begrenztes Repertoire an Signalkaskaden nutzen, wodurch es zu einer umfänglichen Überlagerung der Signale kommen kann und die intrazelluläre Integration maßgeblich die Reaktion der Zelle bestimmt.

Zusammenfassend sind DAMPs und PAMPs in der Lage, über eine Bindung an diverse intra- und extrazelluläre PRRs Signalkaskaden zu aktivieren, die initial zu einer pro-inflammatorischen Reaktion der Zelle durch eine veränderte globale Genexpression führt. Zeitgleich jedoch wird stets eine negative Reaktion initiiert, die das Ziel hat, eine potentiell schädliche Reaktion zu verhindern. Dabei ist die Zelle an sich ein wichtiges Element, ist jedoch selbst nur ein Aspekt der Immunabwehr und ist auto- und parakrinen Einflüssen des Milieus unterworfen (Abb. 3).

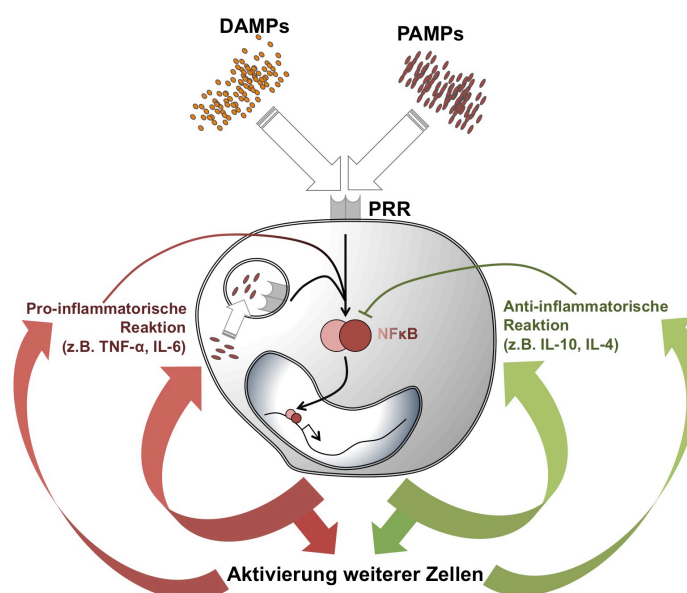


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären Reaktion auf die Erkennung von DAMPs und PAMPs.

1.1.3. Die systemische Inflammation – SIRS und CARS

Immer dann, wenn die kooperativen Versuche von Immun- und Gerinnungssystem scheitern, geschädigtes Gewebe oder entzündliche Herde vom restlichen Organismus abzuschotten, kann es zu dem Übergang von einer lokalen zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommen. Grund hierfür können sehr umfangreiche Verletzungen sein, es reichen aber auch die Verbreitung von Signalmolekülen wie der DAMPs, PAMPs oder (bakterieller) Toxine durch den Blutstrom. Die Folge ist eine systemische Aktivierung des Immunsystems, allen voran des angeborenen Immunsystems. Die Gesamtheit der ausgelösten Symptome wird dabei unter dem Begriff des *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) zusammengefasst. *Per definitionem* spricht man bei einer klinischen Manifestation von mehr als zwei der folgenden Symptome von einem SIRS (4):

- 1.) Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- 2.) Herzfrequenz über 90 Schläge pro Minute
- 3.) Tachypnoe
- 4.) Leukozytenzahl >12.000 oder <4.000 Zellen/ μl

Die Symptome sind hierbei ganz analog zu den fünf Kardinalsymptomen der Inflammation auf die Immunreaktion zurückzuführen. Gekennzeichnet ist die SIRS zudem durch hohe Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP).

Wie im Mikrokosmos der Immunzellen beschrieben, so ist der Organismus auch im Rahmen des SIRS bestrebt, die ausgelöste Reaktion zu balancieren. Dies geschieht durch eine Gegenreaktion, die als *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS) bezeichnet wird (26). Sie nutzt dabei anti-inflammatorische Botenstoffe wie IL-10 oder TGF- β , um die pro-inflammatorische Immunreaktion zu dämpfen. Daneben kommen auch zelluläre Mechanismen zum Einsatz. So inaktivieren sich bestimmte Immunzellpopulationen, allen voran die Monozyten und werden anerg, d.h. sie reagieren nicht mehr auf weitere immunologische Stimuli (27). Gleichsam verlieren sie die Schlüsselfähigkeit der Antigenpräsentation, was durch das Verschwinden des MHC II-Komplexes auf der Zelloberfläche verursacht wird. Das Resultat ist ein „stummes“ angeborenes Immunsystem, dessen Schnittstelle zu den T-Zellen des adaptiven Immunsystems fehlt. Schließlich kommt es zu einem umfangreichen Verlust von B- und T-Zellen durch die Induktion der Apoptose (28). Eine Konsequenz dieser Gegenmaßnahmen ist eine übergangsweise Vulnerabilität des Organismus, die sekundäre Infektionen begünstigt. Ein körperlicher

Ausnahmезustand, in welchem die beschriebenen Mechanismen des SIRS und CARS auftreten, ist die Phase nach Erleiden einer schweren, lebensbedrohlichen Mehrfachverletzung.

1.2. Das Polytrauma

1.2.1. Definition, Prävalenz und Ursachen

Unter der Bezeichnung „Polytrauma“ versteht man den lebensbedrohlichen Zustand eines Patienten, der auf Basis seiner erlittenen Mehrfachverletzungen, entweder aufgrund der Schwere einer einzelnen Verletzung oder deren Kombination, zustande kommt.

In Deutschland zählen „Verletzungen, Vergiftungen und bestimmte andere Folgen äußerer Ursachen“ (ICD-10 Kapitel XIX) zu den fünf häufigsten Todesursachen (2012: 32.031 Todesfälle) (Quelle: Statistisches Bundesamt). Dabei erleiden in Deutschland pro Jahr bis zu 38.000 Personen ein schweres Polytrauma mit einem *Injury Severity Score* (ISS) ≥ 16 . Letzterer ist ein quantitatives Maß für die Verletzungsschwere unter Berücksichtigung der drei am schwersten betroffenen Körperregionen, wobei Kopf, Gesicht, Thorax, Abdomen, Extremitäten und Haut individuell beurteilt werden. Entsprechend der Auswertung aus den im Rahmen des Traumaregister DGU® gespeicherten Versorgungsdaten sind Männer dabei häufiger betroffen als Frauen (70%). Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 46 Jahren und eine schwere Mehrfachverletzung ist mit einer Krankenhaussterblichkeit von bis zu 10% verbunden.

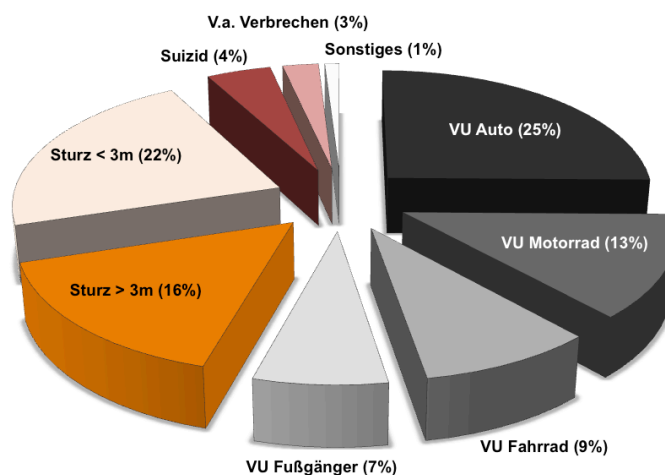


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Ursachen, die zu einer Polytraumatisierung führen. Statistische Angaben wurde dabei dem Jahresbericht 2013 Traumaregister DGU® entnommen. VU: Verkehrsunfall

Zu den Hauptursachen, die zu einer Polytraumatisierung führen, zählen Verkehrsunfälle (insgesamt 54,7%) und Stürze (insgesamt 38%), gefolgt von Suizid

(4,5%) und Gewaltverbrechen (2,5%). In der Gruppe der Verkehrsunfälle führen die Autounfälle das Feld an (25,4%) (Abbildung 4).

1.2.2. Therapie

Die Therapie des polytraumatisierten Patienten orientiert sich an den vorhandenen Verletzungsmustern und gliedert sich zeitlich gesehen in die zwei Abschnitte „Prälinik“ und „Klinische Therapie“. Die Schnittstelle zwischen den beiden Elementen bildet sowohl räumlich als auch organisatorisch der Schockraum, in dem die Übergabe des Patienten vom Rettungsdienst an das Klinikpersonal erfolgt und die erste umfassende Diagnostik durchgeführt wird.

Die präklinische Versorgung polytraumatisierter Patienten beschränkt sich darauf, den Patienten schnellstmöglich für einen Transport zu stabilisieren – *so viel wie nötig, so schnell wie möglich*. Dies liegt nicht zuletzt in den nur eingeschränkt vorhandenen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten begründet. Diese Phase schließt gegebenenfalls den Zeitraum der Rettung des Patienten (aus z.B. einem Fahrzeug) bis zur Übergabe an den Rettungsdienst mit ein. Als zeitliche Daumenregel hält sich bis heute die „golden hour of trauma“, innerhalb derer der Patient in der Klinik angekommen sein sollte (29). Die Stabilisierung beinhaltet das Aufrechterhalten bzw. die Wiederherstellung der primären Körperfunktionen entlang des ABC-Schemas (**A**irway – **B**reathing – **C**irculation) und die provisorische Versorgung vorhandener Verletzungen. Zu den Standardmaßnahmen zählt gemäß der S3-Leitlinie „Polytrauma/Schwerverletztenbehandlung“ bei fehlender oder insuffizienter Spontanatmung die endotracheale Intubation und nachfolgende maschinelle Beatmung, die bei 23,2% der 2012 im TraumaRegister DGU® erfassten Patienten präklinisch durchgeführt wurde. Die Mehrzahl der Patienten erhielt noch am Unfallort eine Volumentherapie (81,5%) und eine Analgosedierung (62,6%), während nur ein kleiner Anteil der Patienten am Unfallort reanimiert wurde (2,7%) oder Verletzungen die Einlage einer Thoraxdrainage (2,9%) notwendig machten. Analog zum globalen Konzept wird den Patienten im Regelfall präklinisch so wenig Volumenersatz wie möglich verabreicht, um im Falle schwerer Blutungen das vorhandene Blutvolumen und damit die Gerinnungsfaktoren nicht weiter zu verdünnen, was zu einer Verschärfung der sowieso oftmals gestörten Gerinnungssituation führen würde (30).

Mit Erreichen des Schockraums steht ein interdisziplinäres Team zur weiteren Versorgung des Patienten zur Verfügung. Beginnend da, wo die Grenzen der präklinischen Diagnostik liegen, beginnt der Schockraumalgorithmus mit einer strukturierten und erweiterten Re-Evaluierung und weiterführenden Stabilisierung des

Patienten. Dazu zählt insbesondere eine schnelle, umfassende Bildgebung durch Sonographie des Abdomens und die sogenannte „Traumaspirale“, d.h. die Durchführung einer Ganzkörper-Computertomographie. Ziel der Bildgebung ist der schnellstmögliche Ausschluss verdeckter Blutungen, die einer sofortigen chirurgischen Intervention bedürfen. Das heutige Konzept der klinischen Erstversorgung basiert, trotz fehlender Evidenz aus kontrollierten Studien, auf der Vermeidung unnötiger Eingriffe zu einem frühen Zeitpunkt nach Trauma, sofern diese nicht zur Behebung lebensbedrohlicher Defekte wie Darmperforationen oder Gefäßrupturen unausweichlich sind (*Damage Control Surgery*) (31). Die endgültige Defektbehebung, insbesondere auch was die Therapie von Knochenbrüchen angeht, erfolgt erst im Verlauf der Behandlung nach ausreichender Stabilisierung sowie Reduzierung und Therapie von Risikofaktoren wie z.B. einer bestehenden Koagulopathie des Patienten. Die weitere Therapiesteuerung erfolgt dabei regelhaft auf Basis einer intensivmedizinischen Versorgung, 2012 wurden 78,1% aller Traumapatienten nach Aufnahme auf eine Intensivstation verlegt und verblieben hier für eine mittlere Verweildauer von 6,8 Tagen ($\pm 10,3$ Tage).

1.2.3. Pathophysiologie des Polytraumas

Durch große äußere Krafteinwirkungen auf den menschlichen Organismus, wie sie im Zuge z.B. eines Verkehrsunfalls entstehen, kommt es zu einer ausgeprägten Zerstörung von Gewebeanteilen. Damit verbunden kommt es immer auch zu einer Schädigung von Blutgefäßen, die einen Blutverlust zur Folge hat. Je ausgeprägter die Verletzungsschwere, umso schwerwiegender sind dabei auch die entstehenden pathophysiologischen Auswirkungen. Grundsätzlich kann man die molekulare Pathophysiologie des Polytraumas in zwei eng miteinander verzahnte Bereiche unterteilen: zum einen die *Trauma-induced coagulopathy* (TIC) und zum anderen die entstehende Immunreaktion mit anfänglichem SIRS (Abb.5).

Die TIC bildet sich durch das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren aus. Der Stein des Anstoßes ist dabei der durch das Trauma verursachte initiale Blutverlust (hypovolämischer Schock) und die endotheliale Schädigung. Durch Letztere kommt es zu Freisetzung von *Tissue Factor* (TF) und resultierend daraus zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade. Aufgrund der engen Verzahnung von Immun- und Gerinnungssystem wird dieser prokoagulatorische Zustand zudem durch die Entzündungsreaktion getragen (3). Es entsteht somit anfänglich eine umfängliche Aktivierung der Koagulation, was zu einem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren beiträgt. Zeitgleich verliert der Organismus durch den Blutverlust Thrombozyten und

humorale Faktoren der Gerinnungskaskade, die nachfolgend nicht mehr zur Verfügung stehen und *per se* eine Blutungsneigung fördern (=Verlustkoagulopathie). In Folge des Schockzustands bildet sich eine Hypoperfusion und Hypoxie der Gewebe aus. Der Organismus reagiert darauf mit einer systemischen Aktivierung der endogenen Antikoagulation und Hyperfibrinolyse, nicht zuletzt durch die Freisetzung von endothelialen Faktoren wie dem *Tissue plasminogen activator* (tPa) (32). Ausgelöst durch die Unterversorgung der Gewebe mit Sauerstoff kommt es zudem zu einer metabolischen Azidose, die zu der manifestierenden Störung der Gerinnung beiträgt. Gleiches gilt für die oftmals entstehende Absenkung der Körpertemperatur, begründet sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch das Unvermögen des Körpers, die Homöostase durch die defizitäre Energiebilanz aufrechtzuerhalten. Der *Circulus vitiosus* aus Koagulopathie, Azidose und Hypothermie wird auch als das *trauma triad of death* (Abb. 5, rechte Seite) bezeichnet (33). Eine Reduzierung der Pathophysiologie auf diesen Bereich trägt jedoch, trotz seiner unzweifelhaft enormen Relevanz für den Patienten, nicht dem zweiten ebenso wichtigen Aspekt Rechnung – der Aktivierung des Immunsystems.

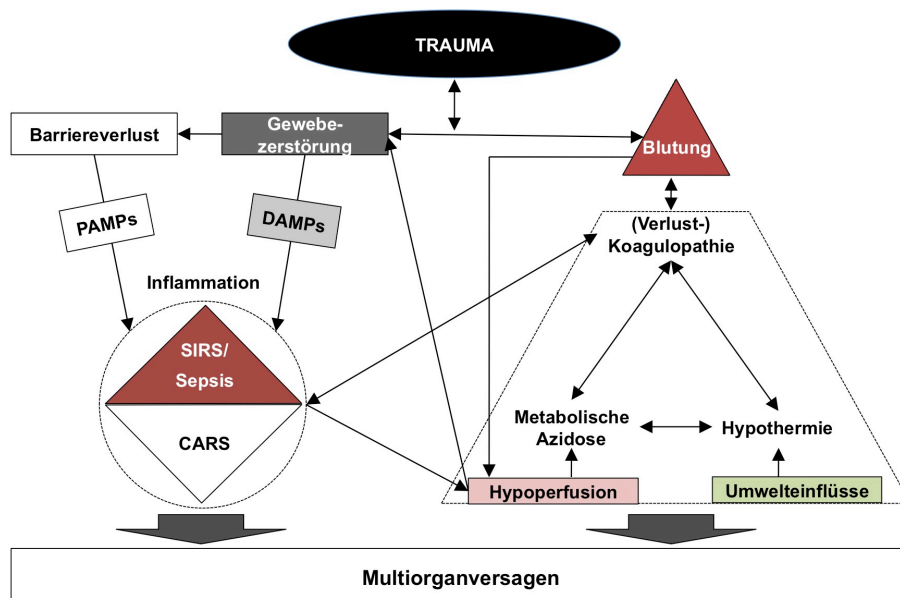


Abbildung 5: Schematische Darstellung der zentralen Eckpfeiler in der Pathophysiologie nach Polytrauma. PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*, DAMPs: *Damage-associated molecular patterns*.

Die Gewebezzerstörung führt in Abhängigkeit von ihrem Ausmaß zur Freisetzung von DAMPs, die zu einer schnellen, systemischen Aktivierung des Immunsystems führen (34). Mit der Gewebezzerstörung geht zudem häufig ein Barriereverlust des Organismus einher, der den Eintritt von Mikroorganismen ermöglicht. Der Grat zwischen SIRS und Sepsis ist bei den Polytraumapatienten sehr schmal, dies spiegelt sich nicht zuletzt

auch in der hohen Inzidenz der Sepsis nach schwerem Trauma wider (35). Die enge Verzahnung von Gerinnung und Entzündung zeichnet sich auch in der Pathophysiologie des Polytraumas ab. Zentrale Faktoren der Gerinnungskaskade wie Thrombin besitzen auch eine pro-inflammatorische Wirkung. Die Entzündungsreaktion führt zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks (Hypotension) bei gleichzeitiger Vasokonstriktion kapillärer Gefäße und verschlimmert die Gewebeminderperfusion. Zudem erhöht sich die Durchlässigkeit des Kapillarendothels, (Kapillarlecksyndrom), was zu einer übermäßigen Extravasation von proteinreichem Plasma führt. Insbesondere in der Anfangsphase nach Trauma ist der Patient durch die umfänglich gestörte Homeostase in Gefahr, ein (Multi-) Organversagen zu erleiden.

In Folge eines SIRS kommt es regelhaft zu einer Gegenregulation des Körpers und einer Phase der eingeschränkten Immunfunktion. Ursächlich ist dafür die schon früh mit der pro-inflammatorischen Reaktion des Organismus initiierte kompensatorische Immunreaktion, die eine Abschaltung des Immunsystems zur Folge hat. Eines der seit langem bekannten und gut untersuchten Phänomene in diesem Kontext ist die Endotoxintoleranz von Monozyten (36). Nach einer ersten Konfrontation der Zellen mit LPS und der damit verbundenen Immunreaktion verlieren die Zellen ihre immunologische Kompetenz, eine erneute Konfrontation löst keine weitere Reaktion aus. Mittlerweile wurde für verschiedene DAMPs, PAMPs aber auch Zytokine gezeigt, dass sie diese Reaktion auslösen können (37-42). Dabei ist die Toleranz nicht auf die Reaktion auf den gleichen Stimulus beschränkt, es entstehen auch Kreuztoleranzen (37,40). Aufgrund der fehlenden Abwehrreaktion entsteht eine Prädisposition des Patienten für opportunistische und nosokomiale Infektionen, die bei der Intensivtherapie des Traumapatienten zu berücksichtigen ist (43).

1.3. Der Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)

1.3.1. Genetik, Regulation und Struktur

RAGE wurde im Jahr 1992 aufgrund seiner Eigenschaft entdeckt, nicht-enzymatisch glykierte Proteine zu binden (44). Noch im gleichen Jahr erfolgte dann die Klonierung und strukturelle Charakterisierung der humanen und bovinen RAGEs (45). Das Gen *AGER*, welches für den humanen RAGE codiert, ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert (6p21.3) und liegt innerhalb der *Major Histocompatibility Complex* Klasse III-Region (46). In der gleichen bzw. in den benachbarten Klasse I und II-Regionen befinden sich zahlreiche weitere Gene, die für immunologisch relevante Proteine codieren. Das *AGER*-Gen selbst umfasst 11 Exons mit insgesamt 1414bp und ist flankiert von einer ungefähr 1550bp überspannenden Promotorregion am 5'-Ende sowie einer kurzen 3'-

UTR. Die 1414bp codieren für 404 Aminosäuren. Die Struktur des Proteins setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Ein Signalpeptid (1-22aa) steuert die zelluläre Distribution des Proteins nach Translation. Der für die Funktion als Rezeptor maßgebliche Anteil des Proteins setzt sich aus drei Immunglobulindomänen zusammen – einer V- Domäne (34-111aa) gefolgt von zwei C2-Domänen (124-219aa und 255-307aa). Der Rezeptor besitzt eine einzelne Transmembrandomäne zur Verankerung in der Plasmamembran (343aa-363aa) und einen sehr kurzen cytoplasmatischen Rest für die Signaltransduktion. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften wird RAGE auch in die Immunglobulin-Familie der Membranrezeptoren eingeordnet.

Die Regulation des Gens erfolgt induzierbar durch mehrere Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 und NF- κ B im 5'-Promotorbereich (47,48). Neben der oben beschriebenen Form des Rezeptors wurden mittlerweile zahlreiche Spleißvarianten identifiziert, von denen die Funktion bislang jedoch nicht geklärt ist (49,50). Zu einer Isoform mit sowohl hoher Abundanz als auch einer potentiellen funktionellen Relevanz zählt das *endogenous secretory RAGE* (esRAGE), welches sich strukturell durch das Fehlen der Transmembrandomäne auszeichnet. Diese Deletion entsteht durch einen Spleißvorgang, bei dem ein Teil des Introns 9 an das Exon 9 bindet. Daraus resultiert eine Rasterverschiebung mit der Entstehung einer alternativen 3'-Sequenz und eines frühen Stopcodons (Abb. 6).

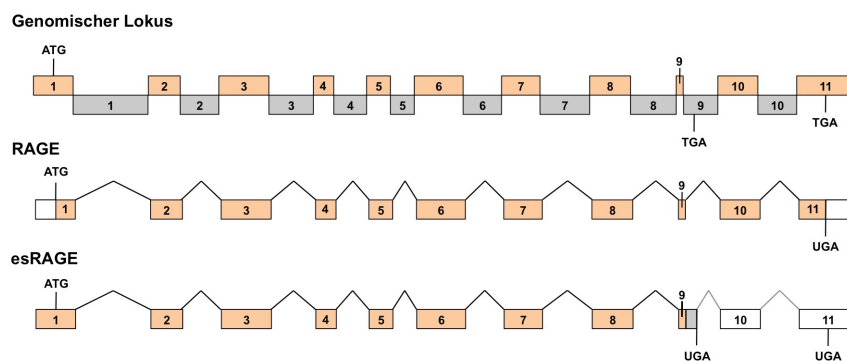


Abbildung 6: Darstellung des genomischen Lokus des AGER-Gens und der Zusammensetzung der Transkriptvarianten RAGE und esRAGE. Orange Boxen repräsentieren Exons, graue Boxen Introns. ATG: Start der codierenden Sequenz, TGA bzw. UGA: potentielle Stopcodons. Modifiziert nach (50).

Analysen zur Expression der Isoformen zeigen eine basale Expression des kompletten Rezeptors in einer Vielzahl von Geweben, während im Bereich der Lunge eine konstitutiv starke Expression vorliegt (51). Uneinheitlichkeit besteht darüber, welche Zelltypen der Lunge letztendlich RAGE exprimieren, sowohl die Pneumozyten Typ I

(52,53) als auch Typ II (54) werden diskutiert, ebenso wie Alveolarmakrophagen und das vaskuläre Endothel der Lungengefäße (55). Eine umfassende Analyse verschiedener Organe in Bezug auf die Expression von esRAGE zeigen auch für diese Isoform eine nahezu ubiquitäre Verbreitung (56).

Eine Besonderheit des membranständigen Rezeptors ist die Tatsache, dass er als Substrat für die Matrixmetalloproteinase *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) fungiert. Diese α -Sekretase führt zu einer proteolytischen Abspaltung des Rezeptors von der Zellmembran und damit zur Entstehung von sRAGE (57,58). Da die Aktivität der Metalloproteinasen nicht zuletzt durch inflammatorische Signale beeinflusst wird, liegt ein negativer Feedbackmechanismus nahe. ADAM10 ist mitunter verantwortlich für die Prozessierung weiterer immunologisch hochrelevanter Proteine wie dem IL-6-Rezeptor und dem TNF-Rezeptor I (59). Als Funktion der löslichen Isoformen (abgespaltenes RAGE und esRAGE) wird neben der Reduzierung der Membranabundanz auch ein Abfangen der Liganden diskutiert. Letzteres wurde bislang jedoch nur *in vitro* und in tierexperimentellen Studien gezeigt (60).

1.3.2. Die Liganden und Signaltransduktion

Die Entdeckung von RAGE geht zurück auf den Versuch zelluläre Proteine zu identifizieren, die an glykierte Proteine binden können (44). Diese so genannten *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) entstehen spontan bei hohem oxidativem Stress und hohen plasmatischen Zuckerspiegeln. Reduzierende Zucker wie Glukose werden hierbei mittels der Maillard-Reaktion kovalent an Proteine und Lipide verknüpft (61). Zusätzlich können AGEs auch durch die Einwirkung der radikalischen Dicarbonylverbindung Methylglyoxal gebildet werden (19). Dieses metabolische Seitenprodukt entsteht im Rahmen der Glykolyse, wird jedoch im Normalfall durch intrazelluläre Enzyme (Glyoxalasen) eliminiert. Ein bekanntes AGE, welches im Rahmen diabetischer Erkrankungen als Biomarker Verwendung findet ist das HbA_{1c}. Durch die Bestimmung des Anteils in Relation zum Gesamthämoglobin ist es möglich, eine Aussage über den Trend der Blutzuckerspiegel der vergangenen Wochen zu treffen.

Über den Lauf der Jahre sind zahlreiche weitere Liganden dazugekommen, die auf den ersten Blick wenige Gemeinsamkeiten besitzen. Zu einem kontrovers diskutierten RAGE-Liganden zählt HMGB1, für welches eine hohe Relevanz in der systemischen Inflammation gezeigt wurde (62), in Abhängigkeit des Redox-Status und gebundener Moleküle jedoch verschiedene Rezeptoren beteiligt zu sein scheinen (63). Zu den

weiteren Liganden zählen zahlreiche Vertreter der Gruppe der S100-Proteine (64), Amyloid β -Peptide (65), Mac-1 (66) und Nukleinsäuren. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass RAGE die Erkennung von extrazellulärer DNA durch den TLR9 kooperativ verbessert, da DNA über RAGE in intrazelluläre Endosomen transportiert und so dem Rezeptor zuführt (67). Auch für LPS, den prototypischen TLR4-Liganden konnte mittlerweile der Nachweis der Bindung an RAGE erbracht werden (68). Dies belegt einmal mehr die redundante Infrastruktur des Immunsystems in Bezug auf die Erkennung evolutiver Muster.

Studien zur räumlichen Proteinstruktur des Rezeptors im Zusammenspiel mit seinen Liganden erbrachten die Erkenntnis, dass die V-Domäne des Rezeptors für die Bindung von AGEs maßgeblich ist und die Bindung auf Basis der Ladungseigenschaften vermittelt wird. Während die V-Domäne eine Konformation mit ausgeprägter positiver Ladung einnimmt, besitzen die AGE-modifizierte Proteine eine negative Ladungsverteilung. Dies erklärt auch die Eigenschaft des Rezeptors Nukleinsäuren zu binden, da diese auf Basis ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ebenfalls eine negative Gesamtladung besitzen (69). Für andere Liganden wie S100A12 oder Amyloid β -Aggregate zeigen Studien, dass jedoch auch die C1-Domäne an der Bindung beteiligt ist (64).

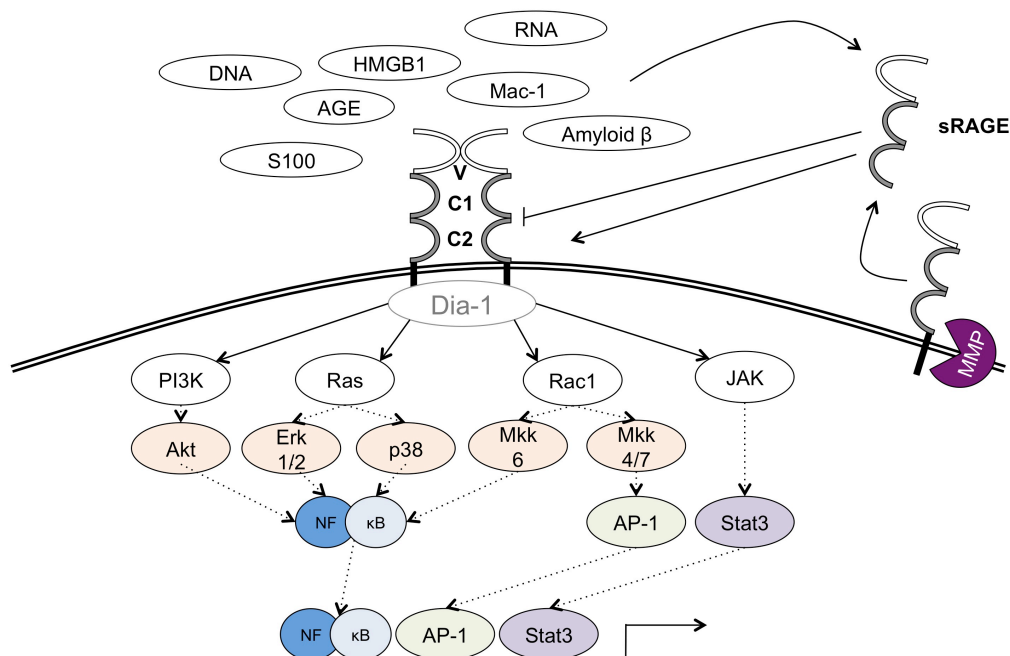


Abbildung 7: Schematische Darstellung des homodimerisierten RAGE, seiner Liganden und angesteuerten Signalkaskaden. MMP: Matrixmetalloprotease, sRAGE: *soluble* RAGE; V, C1 und C2 markieren die jeweiligen extrazellulären Domänen. Modifiziert nach (70)

Für die Generierung eines Signals ist es notwendig, dass der Rezeptor auf der

Zelloberfläche dimerisiert. Diese Interaktion wird dabei möglicherweise in Abhängigkeit des bindenden Liganden sowohl von der V- (71) als auch von der C2-Domäne (72) vermittelt. Man geht mittlerweile davon aus, dass durch den Vorgang der Homodimerisierung die schwache Affinität der Liganden zum Rezeptor erhöht und damit die Voraussetzung für eine Signaltransduktion geschaffen wird (73,74). Blockiert man die Interaktion der membranständigen Rezeptoren durch Zugabe von sRAGE oder V-Peptiden kommt es zu keiner Ausbildung eines Signals (67). Konträr dazu zeigt eine Studie von Wang und Kollegen, dass sRAGE selbst als Ligand agiert (75). Die löslichen Isoformen scheinen damit auch auf zellulärer Ebene eine Rolle bei der Regulation der RAGE-vermittelten Signaltransduktion zu spielen.

Die uncharakteristisch kurze zytoplasmatische Domäne von RAGE ohne erkennbare Homologie zu anderen PRRs erschwerte es lange Zeit, die für die Umschaltung des Signals erforderlichen Adapterproteine zu identifizieren. Erst kürzlich gelang es jedoch, Diaphanous-1 (Dia-1) als einen Kandidaten zu identifizieren und seine Funktion zu verifizieren (76,77). RAGE ist in der Lage, eine große Anzahl verschiedenster Signalkaskaden zu aktivieren, darunter diverse MAP-Kinase-Wege, die Phosphoinositid-3-Kinase sowie G-Proteine wie z.B. Rac-1 und Tyrosinkinasen (Abb. 7) (70). Die aktivierten Signalkaskaden sind dabei abhängig von dem Zelltyp und dem Liganden, es fehlen dazu bislang jedoch systematische Studien. Die Signalkaskaden bündeln sich oft auf Ebene der NF- κ B-Aktivierung, was die grundsätzlich pro-inflammatorische Funktion des Rezeptors widerspiegelt. Interessanterweise wird das Gen für den Rezeptor selbst durch NF- κ B reguliert, was potentiell zu einer Perpetuierung inflammatorischer Prozesse beitragen kann (48).

1.3.3. Relevanz bei inflammatorischen Erkrankungen

RAGE wird als PRR nicht zuletzt auf verschiedenen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert und ist durch diese Schlüsselposition an einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen sowohl steriler als auch septischer Natur beteiligt. Zu den Krankheiten zählen neben Diabetes mit den assoziierten atherosklerotischen Komplikation auch Morbus Alzheimer, pathologische Zustände der Lunge aber auch die Sepsis. Die Beteiligung ist dabei wie im Falle des Diabetes von zentraler Bedeutung in der Pathophysiologie der Erkrankung oder ihrer Komplikationen. Ausgelöst durch persistierend hohe Blutzuckerspiegel kommt es zu einer Akkumulation von AGEs. Die durch die AGE-RAGE-Achse ausgelösten Signalkaskaden tragen dabei wesentlich zu den chronischen Entzündungsprozessen und vaskulären Veränderungen bei (78). Auch in der Entstehung des Morbus

Alzheimer ist die zentrale Rolle von RAGE mittlerweile bekannt. Die Pathologie der Erkrankung basiert auf einer Aggregation von β -Amyloid-Peptiden im Gehirn. Der Transport der Peptide aus dem Blutstrom über die Blut-Hirn-Schranke wird dabei durch RAGE übernommen (79). Neueste therapeutische Ansätze haben eine Blockade dieses Mechanismus zum Ziel (80). Aufgrund seiner hohen Expression in der Lunge liegt eine Beteiligung von RAGE an schwerwiegenden Lungenpathologien wie dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) nahe. Während jedoch in diesem Bereich klare kausale Zusammenhänge fehlen, profiliert sich sRAGE als potentieller Biomarker (81). Im Rahmen der Sepsis, einer systemischen Inflammation auf infektiöser Basis, ist die Fähigkeit von sRAGE als validem Biomarker umstritten (82,83), seine Beteiligung bei der Reaktion des angeborenen Immunsystems konnte jedoch im präklinischen Tiermodell einer Sepsis nachgewiesen werden (84).

1.4. Fragestellung

Die Beteiligung von RAGE an der Pathophysiologie eines Trauma-induzierten SIRS und CARS ist bislang nur oberflächlich beleuchtet worden. Unmittelbar nach Trauma zeigt sich ein Anstieg der sRAGE-Konzentration und des Liganden HMGB1 im Plasma in Abhängigkeit zur Verletzungsschwere (85,86). Keine Erkenntnisse liegen jedoch bislang über das komplexe Zusammenspiel zwischen systemischer (Anti-) Inflammation, der verschiedenen Liganden und Rezeptorformen und der langfristigen Folge einer RAGE-Aktivierung vor. Folgende bislang unbeantworteten Aspekte sollen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden.

- 1.) Wie verhalten sich die Plasmakonzentrationen der RAGE-Isoformen im Verlauf nach Polytraumatisierung?
- 2.) Besitzen sRAGE und esRAGE einen Nutzen als prognostischer und diagnostischer Biomarker, insbesondere im Hinblick auf sekundäre Lungenpathologien?
- 3.) Wie hoch ist die „Last“ an Liganden von RAGE im Verlauf nach Polytrauma und korreliert diese mit inflammatorischen Prozessen?
- 4.) Verändert sich die Abundanz und Expression von RAGE in bzw. auf CD14⁺ - Monozyten nach Trauma und besteht ein Zusammenhang zur HLA-DR-Expression?
- 5.) Was ist die Konsequenz der Aktivierung der RAGE-Achse bezogen auf die globale Funktion der Monozyten?

2. Material

2.1. Software

IBM® SPSS® Statistics (Version 21)

Graphpad Prism (Version 5.0f)

Microsoft® Excel® 2008:Mac

R (Version 3.0.2)

BD CellQuest Pro™ (Version 6.0)

BD FCAP Array™ (Version 3.0.1)

BioTek Gen5™ (Version 1.11)

Applied Biosystems StepOnePlus Software (Version 2.21)

The RT² Profiler PCR Array Data Analysis (Version 3.5)

NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

UCSC *In-Silico* PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>)

2.2. Geräte

BD Bioscience FACSCalibur™ mit Dual-Laser-Option (488 und 633nm)

Apple Mac Pro mit Mac OS X 10.5

BioTek Epoch™ Mikroplattenreader

BioTek ELx50™ Mikroplattenwaschautomat

Applied Biosystems® StepOnePlus™ Realtime-PCR-Cycler

Vilber Lourmat Fusion SL4 Chemilumineszenz-Imager

Olympus BX51WI Mikroskop

Eppendorf Mastercycler® gradient PCR-Cycler

Hettich Mikro 200 R Kühlzentrifuge

Heraeus Minifuge RF Standzentrifuge

Merck Millipore Scepter™ V2.0 automatisierter Zellzähler

Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer

Eppendorf Reference® Pipetten

Life Technologies™ HulaMixer™ Rotationsschüttler

Life Technologies™ DynaMag™-15 Magnettrack

2.3. Oligonukleotide und Sonden

TaqMan® Gene Expression Assays (alle Applied Biosystems®)

Zielgen	Assay-ID
TLR2	Hs00610101_m1
TLR4	Hs00152939_m1
TLR5	Hs00152825_m1
AGER	Hs00542588_g1
TNF-α	Hs01113624
β-Actin	Hs99999903_m1

Primer für RT-PCR (Synthese von Life Technologies, fw: *forward*, rev: *reverse*)

Zielgen	Sequenz (5' → 3')		T _{Annealing} [°C]
TLR2	fw rev	GTG CCC ATT GCT CTT TCA C CAT TGG ATG TCA GCA CCA GA	alle 60°C
TLR4	fw rev	TTC TCA ACC AAG AAC CTG GAC CAG GGC TAA ACT CTG GAT GG	
TLR5	fw rev	CCT CAT GAC CAT CCT CAC AGT CAC GGC TTC AAG GCA CCA GCC ATC TC	
AGER	fw rev	CAC ACT GCA GTC GGA GCT AA GCT ACT GCT CCA CCT TCT GG	

2.4. Kits

eBioscience Annexin V Apoptosis Detection Kit

Applied Biosystems® TaqMan® Gene Expression Master Mix

Invitrogen™ Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes

Promega GoTaq® Flexi Polymerase Kit

QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit

QIAGEN QIAshredder

QIAGEN QuantiTect® Reverse Transcription Kit

Quantum™ APC MESF Calibration Kit (Bangs Laboratories, Inc.™)

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit

BD™ Quantibrite™ PE Beads

BD™ Pharmingen Fixation and Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop™

SABioscience™ RT² Profiler™ PCR Array Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway

SABioscience™ RT² SYBR® Green qPCR Mastermix

SABioscience™ RT² First Strand Kit

Greiner Leucosep™ Röhrchen mit Trennscheibe

R&D Systems Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Panel A

2.5. Chemikalien

LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich)
AGE-BSA (Endotoxin < 0,002 EU/mg, BioVision)
Zymosan (depleted, Invivogen)
Albumin Fraktion V (Carl Roth)
Propidiumiodid (Carl Roth)
 β -Mercaptoethanol (Carl Roth)
Flagellin (high purity, AdipoGen)
Ethanol, absolut
Wasser für Molekularbiologie, DEPC-behandelt (Carl Roth)
Cytokine-HMGB1 (Endotoxin < 4 EU/mg, HMGBiotech)
Chemotaxis-HMGB1 (Endotoxin < 4 EU/mg, HMGBiotech)
Recombinant Human RAGE-Fc-Chimera (R&D Systems)
Substrate Reagent Pack (Substratlösung für colorimetrische ELISA-Detektion, R&D Systems)
Reagent Diluent Concentrate (Verdünnungslösung für ELISA, R&D Systems)
UltraPure™ Agarose (Invitrogen™)
SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™)
Human TruStain FcX™ Fc Receptor Blocking Solution (BioLegend)
FACS™ Lysing Solution (10x) (BD Bioscience)
50x TAE-Puffer (Carl Roth)
DNA-Marker (100-1000 bp) (Fermentas)

2.6. Verbrauchsmaterial

Zellkulturplatten, diverse Größen (Greiner CELLSTAR®)
FACS-Röhrchen (Sarstedt)
Pipettenspitzen (RNase-, DNAase-, Pyrogenfrei) (Nerbe Plus)
Serologische Pipetten (RNase-, DNAase-, Pyrogenfrei) (Greiner Bio-One Cellstar®)
Platten für Realtime-PCR (Applied Biosystems® MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml)
Abdeckfolie für Realtime-Platten (Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film)
Sarstedt S-Monovette® EDTA (7,5 ml)
Sarstedt Safety-Multifly®-Set

2.7. Zellkultur

Gibco® RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin und HEPES

PromoCell Monocyte Attachment Medium (MAM)

Gibco® Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7,2

PAA Fötale Kälberserum (FCS) Clone (Endotoxin < 1EU/ml)

2.8. Antikörper

Antikörper	eingesetzte Menge (Volumen)	Firma	Katalognr.
anti-CD14-FITC	0,2 µg (20 µl)	BioLegend	301804
α-RAGE-APC	4 µg (20 µl)	Santa Cruz	sc-80652
Isotyp-APC	4 µg (20 µl)	Santa Cruz	sc-2889
Quantibrite™ HLA-DR/Monocyte	proprietär (20 µl)	BD	340827
anti-TLR2-PE, mouse IgG2a	2 µg (20 µl)	Biolegend	309708
anti-TLR4-PE, mouse IgG2a	2 µg (20 µl)	Biolegend	312806
anti-TLR5-Alexa 488, mouse IgG1	0,25 µg (5 µl)	R&D Systems	FAB67046
Isotyp für TLR2/4	2 µg (20 µl)	eBioscience	12-4724-42
Isotyp für TLR5	0,25 µg (20 µl)	R&D Systems	IC002G
anti-TNF-α-APC, mouse IgG1	0,0625 µg (5 µl)	BD	340534
Isotyp für TNF-Antikörper	0,0625 µg (0,31 µl)	BD	554681

2.9. ELISA

R&D Systems Human RAGE Quantikine ELISA

B-Bridge International esRAGE Human ELISA

R&D Systems Human Interleukin-6 Quantikine ELISA

R&D Systems Human TNF-alpha DuoSet

Cell Biolabs Inc. OxiSelect™ Advanced Glycation Endproducts ELISA

Cell Biolabs Inc. OxiSelect™ N-ε-(carboxymethyl) lysine (CML) Competitive ELISA

Cell Biolabs Inc. OxiSelect™ Methylglyoxal (MG) Competitive ELISA

MBL International CircuLex S100A12/EN-RAGE ELISA Kit

RayBio® Human S100A8 ELISA Kit

Shino-Test Cooperation HMGB1 ELISA

3. Methoden

3.1. Studiendesign

3.1.1. Studie 1: Retrospektive Biobankkohorte

Ethische Beurteilung

Die erstmalige ethische Begutachtung erfolgte durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der JLU im Jahr 2001. Auf Basis dieser Begutachtung wurde für die Sammlung und Lagerung von Biomaterialien („Biobank“) im Rahmen des *Giessen Research Center in Infectious Diseases*, eines Teilprojekts des Nationalen Genomforschungsnetzwerks (NGFN-1), ein positives Votum erteilt (Aktenzeichen 79/01). Vor Entnahme des Probenmaterials aus der Biobank für diese Studie wurde die ethische Vertretbarkeit 2012 erneut durch die Ethikkommission evaluiert und zustimmend bewertet (Aktenzeichen 221/12).

Patienten wurden entsprechend der gesetzlichen Rahmenbedingungen gemäß GCP-Verordnung und der Deklaration von Helsinki nur eingeschlossen, sofern der Patient selbst oder ein gesetzlicher Vertreter seine informierte Einwilligung gegeben hat.

Charakteristik

Die Probengewinnung erfolgte mit dem Ziel der Einlagerung in eine Biobank im Rahmen einer prospektiven, nicht-interventionellen Studie direkt nach Einschluss und im Verlauf der stationären Therapie alle 48h für maximal 5 Entnahmen.

Insgesamt wurden der Biobank Proben von 77 Patienten nach Polytraumatisierung entnommen. Voraussetzung für die Entnahme war das Vorhandensein von mindestens zwei initialen Proben (bei Einschluss und 48 später).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kohorte wurde auch für die Analyse weiterer Parameter verwendet. Die Ergebnisse dieser Zweitanalyse wurden in der Doktorarbeit „Analyse von Zelltodparameter nach Polytrauma“ (Denise van den Nouland) veröffentlicht.

Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Rekrutierung der Patienten wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

<u>Einschlusskriterien</u>	<u>Ausschlusskriterien</u>
• Polytrauma (ISS$\geq$16) • Alter $\geq$ 18 Jahre und $\leq$80 Jahre • Aufnahme Intensivstation $\leq$24h nach Trauma	• Reanimation / kardiogener Schock • Verabreichung (nicht-)steroidaler Antiphlogistika • Schwangere Frauen bzw. Frauen in der Stillzeit • Teilnahme an einer anderen Studie • Patienten mit Verbrennungen (alle Grade) • Versterben innerhalb von 48h nach Aufnahme

Parameter

Für die eingeschlossenen Patienten lagen keine Versorgungsdaten vor. Sofern diese notwendig waren, wurden diese retrospektiv aus dem Patienten-Daten-Management-System (PDMS) ICUData (IMESO® GmbH) extrahiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden konkret folgende Parameter benötigt:

- Demographie (Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht)
- Vorerkrankungen
- Ursache der Polytraumatisierung
- Verletzungsmuster zur Berechnung des Injury Severity Score
- Outcome der Patienten (28-Tage-Sterblichkeit)
- FiO₂ und PaO₂ zur Bestimmung des Horovitz-Quotienten

Aus den Plasmaproben der Biobank wurden die Konzentrationen an sRAGE, esRAGE und IL-6 mittels ELISA bestimmt.

3.1.2. Studie 2: RiSaP – RAGE in Sepsis after Polytraumatization

Ethische Beurteilung

Eine Beratung durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der JLU wurde vor Beginn der Rekrutierungsphase durchgeführt, das Vorhaben wurde mit Bekanntgabe vom 03.12.2009 positiv bewertet. (Aktenzeichen des Votums: 127/09). Ergänzend dazu erfolgte am 30.11.2010 die zustimmende Beurteilung bezüglich des eingereichten Amendments vom 05.11.2010 zum Einschluss von Patienten nach

großen viszeralchirurgischen Operationen als ergänzende Kontrollgruppe. Die Studie ist in das Deutsche Register Klinischer Studien (DRKS) unter der Identifikationsnummer DRKS00000480 eingetragen.

Der Einschluss der Patienten erfolgte nach Einholen des *informed consent* von den Patienten selbst oder im Falle einer Nicht-Einwilligungsfähigkeit auf Basis des „Gießener Modells“. Im Rahmen dieses mehrstufigen Verfahrens erfolgt zunächst die Feststellung der Nicht-Einwilligungsfähigkeit durch einen zweiten unabhängigen und nicht der Abteilung angehörigen Konsiliararzt. Im Anschluss daran wird der Patient, sofern keine Erkenntnisse vorliegen, dass die Studienteilnahme dem mutmaßlichen Willen des Patienten widerspricht, eingeschlossen und der Antrag auf Einrichtung einer gesetzlichen Betreuung eingeleitet. Sofern diese besteht, erfolgt auch hier die Aufklärung zur Studienteilnahme. Schließlich wird der Patient unmittelbar nach Wiedererlangen der Einwilligungsfähigkeit selbst aufgeklärt und seine Einwilligung eingeholt. Sofern eine Instanz des Verfahrens einer Teilnahme widerspricht, erfolgt der Ausschluss des Patienten und ggf. die Vernichtung von bisher gewonnenem Material. Die Aufklärung der Patienten mit großen Operationen bzw. der Probanden erfolgt im Vorfeld.

Charakteristik

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive, nicht-interventionelle Beobachtungsstudie mit explorativem Charakter. Eingeschlossen wurden im Zeitraum zwischen August 2010 und Dezember 2013 Patienten nach Polytraumatisierung (n=18) und im Rahmen von Kontrollkollektiven gesunde Probanden (n=10) und Patienten nach großen viszeralchirurgischen Operationen (n=10). Die Blutentnahmen (je 20ml) erfolgten innerhalb von 12h nach Aufnahme („Einschluss“) sowie im Falle des Studienkollektivs und der operativen Kontrollgruppe 48 h, 96 h, 144 h und 192 h danach. Sofern der Patient im Verlauf die Überwachungsstationen (*Intermediate Care* und *Intensive Care Unit*) verlassen hat, wurden keine weiteren Blutentnahmen durchgeführt. Bei gesunden Probanden erfolgte nur eine einmalige Blutentnahme.

Aufgrund einer unerwartet geringen Rekrutierungsrate in das Studienkollektiv, nicht zuletzt aufgrund der stringenten Ausschlusskriterien, wurde die geplante Zahl der Patienten (n=40) nicht erreicht und die Studie nach Einschluss von 18 Patienten mit Polytrauma beendet.

Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Rekrutierung der Patienten in das Studienkollektiv wurden folgende Kriterien definiert:

<u>Einschlusskriterien</u>	<u>Ausschlusskriterien</u>
• Polytrauma (ISS$\geq$16) • Alter $\geq$ 18 Jahre	• Nichterfüllen der Einschlusskriterien • bestehende terminale Niereninsuffizienz • bestehender Diabetes mellitus (Typ I und II) • bestehende maligne Erkrankung • bestehende Autoimmunerkrankung (z.B. Morbi Crohn oder Alzheimer, rheumatoide Arthritis) • Arteriosklerose mit stattgehabter Myokardialer Ischämie bzw. ACVB-OP bzw. PTCA/Stent • Schwangerschaft

Die Einschlusskriterien der Kontrollgruppen waren bei Berücksichtigung der gleichen Ausschlusskriterien wie das Studienkollektiv wie folgt definiert:

<u>Einschlusskriterien „gesund“</u>	<u>Einschlusskriterien „post-OP“</u>
• Alter $\geq$ 18 Jahre	• Alter $\geq$ 18 Jahre • offene viszeralchirurgische Operation großen Umfangs (Pankreaskopfresektion, Gastrektomie o.ä.)

Aufarbeitung der Blutproben

Nach Entnahme erfolgte unmittelbar die Aufarbeitung der entnommen Blutprobe. Von den insgesamt 20ml Blut wurden 2ml für durchflusszytometrische Messungen verwendet, das Restvolumen wurde bei 1200 x g für 10 min bei RT abzentrifugiert, die Plasmafraktion abgenommen und bei -80 °C in 250 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die zelluläre Fraktion wurde mit PBS auf 30 ml verdünnt und daraus mittels Ficollgradienten die *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) isoliert. Im Anschluss erfolgte bei einem Teil der Patienten die Isolation der Monozyten mittels negativer Selektion, zum Teil wurden die Zellen jedoch nach der Waschung unselektiert in RNeasy® resuspendiert und bei -80 °C asserviert. Sofern eine Isolation der Monozyten mit ausreichender Effizienz erfolgreich war, wurde aus den Zellen die

RNA isoliert und für weiterführende Genexpressionsanalysen verwendet. Die detaillierten Protokolle sind auf den folgenden Seiten dieses Abschnitts dargestellt.

Folgende Parameter wurden im Rahmen der RiSaP-Studie im Labor bestimmt:

Expression von RAGE auf CD14 ⁺ - Monozyten (Antigendichte und % positive Zellen)	Durchflusszytometrie
Monozytären HLA-DR-Expression	
Konzentration von Zytokinen und RAGE-Liganden im Plasma (Interleukin-6, HMGB1, S100A8, S100A12, AGE-, CML-Methylglyoxal-modifizierte Proteine)	ELISA
Konzentration der RAGE-Isoformen im Plasma (sRAGE und esRAGE)	

3.2. Zellkultur

3.2.1. Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen

Die Zelllinie Mono Mac-6 wurde direkt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit einem Anteil von 10 % FCS bei 37 °C unter 5 % CO₂. In der Zellkultur wurden keine Antibiotika eingesetzt, um etwaige Kontaminationen der Kultur frühzeitig zu erkennen. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 2-3 Tage, um eine maximale Kulturdichte von 10⁶ Zellen/ml nicht zu überschreiten.

Für alle Experimente mit Stimulation der Zellen wurden die Zellen in einer Dichte von 0,5x10⁶ Zellen/ml eingesetzt. Je nach Größe des Zellkultursystems wurden somit absolut folgende Zellzahlen eingesetzt:

96-Well:	3x10 ⁵ Zellen (in 0,3 ml)
12-Well:	0,5x10 ⁶ Zellen (in 1 ml)
6-Well:	10 ⁶ Zellen (in 2 ml)

Der Gehalt an toten Zellen wurde regelmäßig mittels Trypanblaufärbung und mikroskopischer Evaluation überprüft, bei mehr als 5 % toten Zellen wurde die Kultur abgebrochen.

3.2.2. Gewinnung und Kultivierung primärer Monozyten

3.2.2.1. Vom Vollblut zu PBMCs

Zur Gewinnung von PBMCs aus *Buffy Coats* bzw. frischem, antikoagulierten Vollblut wurde die zelluläre Fraktion mit PBS im Verhältnis 1:2 (Zellvolumen:Volumen PBS)

verdünnt, maximal 30 ml der Suspension über eine Ficollphase geschichtet und bei 800 x g für 15min bei RT in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Um eine Kontamination mit Thrombozyten zu vermeiden, wurde die Phase oberhalb des Zellrings vorsichtig mit einer serologischen Pipette aspiriert und der freigelegte Zellring dann mittels einer sterilen Pasteurpipette entnommen. Die gewonnenen PBMCs wurden vor der weiteren Verwendung insgesamt 3x mit 20 ml PBS-BSA (0,5 %) gewaschen, die Zentrifugation zwischen den Waschschritten erfolgte bei 250 x g für 5 min.

3.2.2.2. Isolation von Monozyten mittels Adhärenz

Primäre Monozyten zeichnen sich im Gegensatz zu Lymphozyten durch die Eigenschaft aus, nach Aussaat in Zellkulturschalen übergangsweise zu adhären und können dadurch isoliert werden. Seit der ersten Beschreibung dieses Verfahrens im Jahr 1966 (87) wurden die Protokolle ständig verfeinert und neue Reagenzien zur Vereinfachung des Ablaufs und zur Erhöhung von Ausbeute und Reinheit entwickelt. Kritisch für die Reinheit der Isolation ist zum einen die Eigenschaft der verwendeten Zellkulturschalen und zum anderen das verwendete Medium. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Experimente in Zellkulturschalen durchgeführt, die für die Kultivierung von Suspensionszellen vorgesehen sind. Durch die Plastikkomposition wird die Anheftung der Zellen nicht begünstigt und die Stringenz der Isolation erhöht. Als Isolationsmedium wurde ein spezialisiertes Medium (MAM - *Monocyte Attachment Medium*) eingesetzt. Nach Isolierung der PBMCs über den Ficollgradienten wurde der Gehalt an Monozyten und die Zellzahl mittels Impendanzzytometrie (siehe „Zellzahlbestimmung mit Scepter“) bestimmt. Bei einem Monozytengehalt > 25 % wurde eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/cm² eingesetzt, bei weniger als 25 % Monozyten entsprechend $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm². Um diese Zelldichte zu erreichen, wurde die Zellsuspension entsprechend durch Zugabe von MAM eingestellt. Im Falle einer Aussaat in 6-Well-Schalen (Grundfläche: 9,5 cm²) wurde die Zellkonzentration auf 10 bzw. 15×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 1 ml der Suspension ausplattiert. Nach Inkubation im CO₂-Inkubator erfolgte das Entfernen der nicht-adhärierter Zellen durch zweimaliges, stringentes Waschen mit MAM. Dabei wurde das Medium pro Waschschriff mehrfach mit einer Pipettenspitze über den Zellrasen gespült. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von neuem Medium, nach Isolation wurden die Zellen in RPMI mit 10 % FCS kultiviert. Vor der Durchführung der weiteren Versuche wurden die Zellen für eine Ruhephase von 3 h im Inkubator belassen.

3.2.2.3. Isolation von Monozyten mittels negativer Bead-Selektion

Die negative Selektion von Monozyten basiert auf der positiven Selektion und Beseitigung der unerwünschten Zellpopulationen aus einer Zellsuspension. Bead-basierte Methoden nutzen zum einen die Fähigkeit von Antikörpern, spezifische Epitope zu erkennen und zum anderen die Unterscheidbarkeit von Immunzellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker. Zum Zwecke der Isolation werden Antikörper-Bead-Komplexe gebildet, die selektiv an Zellen binden. Durch die magnetischen Eigenschaften der Beads können die Zell-Antikörper-Bead-Komplexe dann mittels eines starken Magneten aus der Suspension „gezogen“ werden. Der Vorteil der negativen gegenüber der positiven Selektion ist, dass die zu isolierende Population nicht direkt durch Antikörper gebunden wird, was zu einer Stimulierung der Zellen führen kann. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass die Effizienz der Isolation stark von der Abundanz der verschiedenen Oberflächenantigene der zu beseitigenden Zellpopulation abhängt. Verliert eine Zellpopulation aufgrund eines pathologischen Zustands seinen Oberflächenmarker, so können diese Zellen nicht mehr zuverlässig markiert und entfernt werden und der Reinheitsgrad der Isolation fällt deutlich ab. Dieses Phänomen konnte auch bei der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. In Patienten nach Polytraumatisierung zeigen sich sehr schwankende Reinheiten, die möglicherweise durch die systemische Reaktion der Immunzellen und Thrombozyten auf die Verletzung oder therapeutische Interventionen wie z.B. Transfusion von Blutprodukten ausgelöst werden.

Zur Isolation der Monozyten wurden im Rahmen der Studie maximal 5×10^7 PBMCs nach Ficoll-Isolation eingesetzt. Diese wurden in 500 μ l Isolationspuffer (PBS + 0,1% BSA + 2mM EDTA) resuspendiert und mit jeweils 100 μ l *Blocking Reagent* und *Antibody Mix* (biotinylierte Antikörper gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CDw123 und CD235a) versetzt. Nach 20 min rotierender Inkubation bei 4 °C mit gelegentlichem Schütteln wurden die Zellen bei 350 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l neuem Isolationspuffer resuspendiert. Parallel wurden die Streptavidin-gecoateten Beads vorbereitet. Dazu wurden 500 μ l der Beadsuspension mit 5 ml Isolationspuffer verdünnt und das Röhrchen in den Magneten gestellt. Nach 2 min waren die Beads an der Seite des Röhrchens lokalisiert, so dass der Puffer mittels einer Pasteurpipette entfernt werden konnte. Anschließend wurden die Beads durch Zugaben von 1 ml neuem Isolationspuffer rekonstituiert. Die gewaschenen Zellen und Beads wurden im nächsten Schritt vereinigt und für weiter 15 min rotierend bei 4 °C mit gelegentlichem Schütteln inkubiert. Um Aggregate aufzulösen, wurde die Suspension mehrmals durch eine 1000er-Pipettenspitze resuspendiert. Nach einer weiteren Zugabe von 5 ml Isolationspuffer erfolgte die

Entfernung der jetzt Bead-markierten unerwünschten Zellen. Dazu wurde das Röhrchen in den Magneten gestellt. Die Zell-Bead-Komplexe wurden so an den Rand des Röhrchens gezogen, in Suspension verbleiben im besten Fall nur die Monozyten. Mittels einer Pasteurpipette wurde die Monozytensuspension entnommen, neuer Puffer (5ml) zugegeben und die Beads erneut resuspendiert. Nach erneuter Positionierung des Röhrchens wurde auch dieser Puffer entnommen und mit der 1. Fraktion vereinigt. Zur Vorbereitung für die RNA-Isolation wurden die Monozyten im letzten Schritt durch eine Zentrifugation bei 350 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert.

Sowohl nach der PBMC-Isolation als auch nach der Gewinnung der Monozyten wurden Aliquots für die Analyse der Reinheit mittels Durchflusszytometrie entnommen.

3.2.3. Quantifizierung der Zellen

Die Quantifizierung der Zellen erfolgt entweder optisch mittels Hämozytometer (Zellkulturzellen) oder automatisiert mittels Impedanzzytometrie (Merck Millipore Scepter™) für PBMCs.

Für die Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (0,5 %) gemischt und die vorbereitete Zählkammer mit 20 µl befüllt. Zur Vorbereitung der Zählkammer wurde diese gereinigt und das Deckglas nach Anhauchen so aufgeschoben, dass im Bereich der Auflageflächen die Newtonschen Ringe erkennbar waren. Durch dieses Zeichen war gewährleistet, dass der Abstand exakt 0,1 mm beträgt, was für eine valide Messung der Zellzahl unumgänglich ist. Die Zellen der 4 großen Eckquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt (getrennt nach gefärbten und ungefärbten Zellen) und die Konzentration nach folgender Formel unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet:

$$Konzentration \left[\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} \right] = \frac{\text{Zellen}_{\text{gesamt}}}{4} \times 10 \times 2$$

PBMCs wurden mithilfe des Scepter-Impedanzzytometers quantifiziert. Das Verfahren basierend auf dem Ohm'sche Gesetz ähnelt der Durchflusszytometrie, nutzt jedoch anstatt optischer Detektion die durch eine Passage von Zellen an Elektroden ausgelösten Änderungen im Stromfluss. Vorteil der Methode ist, dass neben der Zellzahl auch der Anteil verschiedener Zellpopulationen anhand unterschiedlicher Zellgrößen und -volumen erfasst werden kann. Insbesondere die Abschätzung des Monozytengehalts der PBMCs, was für die Isolation der Zellen mittels Adhärenz

notwendig ist, war aufgrund der Größenunterschiede Lymphozyten zu Monozyten einfach möglich.

3.2.4. Doppelstimulationsexperimente

Für Versuchsreihen, in denen die Zellen sequentiell stimuliert wurden war es wichtig, zwischen den Stimulationen einen Wechsel des Mediums durchzuführen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass eventuell nach der 1. Stimulation der Zellen gebildete Zytokine die Messergebnisse nach der 2. Stimulation überlagern und beeinflussen können. Der Mediumwechsel erfolgte dabei stets direkt in den Multiwellplatten, die zu diesem Zweck zunächst bei 350 x g für 10 min bei RT in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert wurden. Die Zellen sammeln sich während der Zentrifugation am äußeren Rand der Zellkulturschale, so dass das Medium ohne Zellverlust entfernt werden konnte. Nach Zugabe des neuen Mediums erfolgte stets eine gründliche Resuspendierung der Zellen. Die 2. Stimulation erfolgte unmittelbar nach Mediumwechsel für 3 bzw. 24 h, je nach Parameter (Abb. 8).

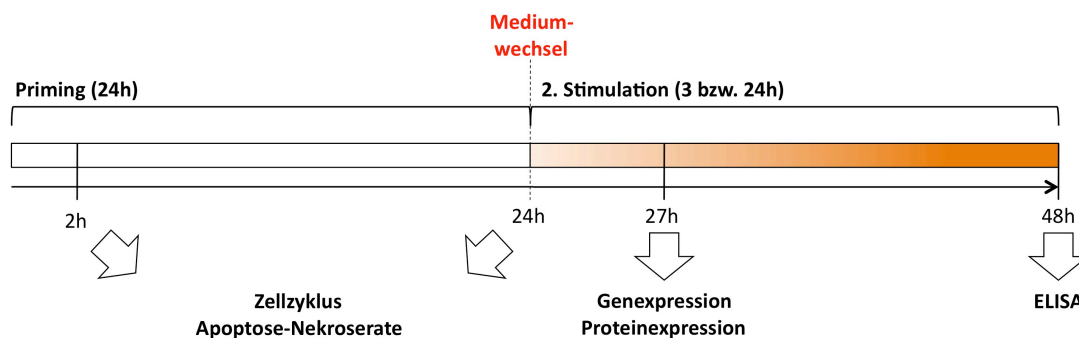


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Doppelstimulationsexperimente und der durchgeführten Analysen.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Stimulation der Zellen mit folgenden Endkonzentrationen:

AGE-BSA	100 µg/ml	Chemokin-HMGB1	1 µg/ml
LPS	100 ng/ml	Lipoteichonsäure	1 µg/ml
Zymosan	25 µg/ml	Pam3CSK4	1 µg/ml
Flagellin	100 ng/ml	sRAGE-Fc	1 µg/ml
Zytokin-HMGB1	1 µg/ml		

3.3. Genexpressionsanalyse mit PCR

3.3.1. Isolation von RNA

Für die Extraktion von RNA aus Zellkulturzellen und primär isolierten Monozyten wurde ein Säulen-basiertes Kit verwendet (Qiagen RNeasy Plus Mini Kit). Kern dieser Methode stellt eine Silikamatrix dar, die unter chaotropen Bedingungen Nukleinsäuren (und auch andere hydrophile Moleküle) binden kann. Die Zellen wurden im ersten Schritt lysiert, dabei erfolgte die Zugabe von β -Mercaptoethanol in den Lysepuffer zur effizienten Denaturierung der Zellproteine. Dies verbessert die Reinheit der nachfolgenden Isolation. Zur Sicherstellung einer homogenen Lyse wurden die Proben mit $11.200 \times g$ für 1 min durch eine Siebsäule (QIAshredder) zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die genomische DNA durch die Zentrifugation der lysierten Probe durch eine Mini-Säule bei $11.200 \times g$ für 1 min entfernt. Das Eluat wurde mit gleichem Anteil 70 % Ethanol versetzt und auf die RNA-Isolationssäule geladen. Beim Durchgang der Probe durch die Säule bindet die RNA über Wasserstoffbrücken an die Matrix. Die noch vorhandenen Kontaminationen mit Lipiden und Proteinen werden durch 3 Waschschrte (700 μ l RW1, 2x 500 μ l RPE) entfernt. Die Zentrifugation erfolgte zwischen den Schritten jeweils $11.200 \times g$ für 1 min.

3.3.2. Quantifizierung mittels NanoDrop™

Die photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zu besitzen. Eine Extinktion von 1 entspricht dem Lambert-Beer'schen-Gesetz folgend bei einer Schichtdicke von 1cm einer RNA-Konzentration (einstängig) von 40 μ g/ml. Das NanoDrop™-System ermöglicht die Quantifizierung der RNA mit sehr geringen Probenvolumina (1 μ l) im Vergleich zur konventionellen photometrischen Messung mittels Quarzküvette. Dies wird erreicht durch die deutliche Reduktion des Lichtweges. Analog zum konventionellen Photometer erfolgt vor Messung die Ermittlung des Nullwertes („Blank“) durch Messung von Wasser. Folgend erfolgt die Messung der Proben. Das NanoDrop™-System erfasst dabei die Extinktion im gesamten Spektrum von 220 bis 350 nm. Dies ermöglicht eine Qualitätskontrolle der isolierten RNA in Bezug auf eine Kontamination mit Proteinen. Diese besitzen ein Absorptionsspektrum bei 280 nm, das Verhältnis zwischen 260/280 nm ist ein Indikator für die Reinheit. Nur Isolationen mit einem $\text{Ratio}_{260/280 \text{ nm}} > 1,8$ wurden für PCR-Analysen verwendet.

3.3.3. Reverse Transkription

Als Voraussetzung für die Analyse der Genexpression mittels PCR muss die isolierte einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA (cDNA) überführt werden. Die Enzyme der Gruppe der Reversen Transkriptasen (RT) sind multifunktionale Proteine, die ursprünglich aus Retroviren isoliert wurden und dort den Einbau des aus einzelsträngigen RNA-Strängen bestehenden viralen Genoms in das Wirtsgenom ermöglichen. Für die effiziente Überführung von RNA in DNA muss das Enzym verschiedene Eigenschaften besitzen:

- 1.) RNA-abhängige DNA-Polymerase
- 2.) RNase H- Aktivität
- 3.) DNA-abhängige DNA-Polymerase

Für diese Arbeit wurden die RT-Reaktionen mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit durchgeführt (mit Ausnahme der cDNA-Synthese für das qPCR-Array). Dieses Kit ermöglicht im ersten Schritt eine Eliminierung eventuell vorhandener genomischer DNA. In die Reaktion wurden, je nach vorhandenem Ausgangsmaterial, 250-1000 ng RNA eingesetzt. Für alle Proben, die in der folgenden PCR verglichen werden sollten, wurden gleiche Mengen eingesetzt. Nach dem initialen DNA-Eliminierungsschritt (2 min bei 42 °C) wurden Puffer, Primer und RT-Enzym zugegeben und die tatsächliche RT-Reaktion für weitere 20 min bei 42 °C durchgeführt. Die Zeit wurde im Vergleich zum Standardprotokoll um 5 min erhöht, um eine effiziente RT auch bei RNAs mit komplexer Sekundärstruktur zu gewährleisten.

3.3.4. Endpunkt-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Molekülen. Ähnlich zur Reversen Transkription der RNA spielt auch bei der PCR ein Enzym die tragende Rolle, in diesem Falle die DNA-abhängige DNA-Polymerase. Zur Durchführung einer PCR benötigt man neben der Polymerase auch kurze einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen (Primer), die komplementär zur Sequenz der Zielsequenz sind und an diese binden. Die Primer sind von hoher Relevanz, da sie die Spezifität der PCR-Reaktion festlegen. Die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden mittels des Onlinetools Primer-BLAST entworfen und die optimale Temperatur zur Bindung des Templates vor der Verwendung bestimmt. Grundsätzlich wurden alle verwendeten Primer so entworfen, dass die Bindestellen in unterschiedlichen Exons des Transkripts lagen und somit anhand der Produktgröße der PCR zwischen

amplifizierter cDNA und kontaminierender genomischer DNA unterschieden werden konnte.

Um eine DNA-Sequenz zu amplifizieren, besteht die PCR aus einer Wiederholung verschiedener Temperaturphasen. In der ersten Phase (üblicherweise 94 °C) werden die komplementären DNA-Stränge getrennt. Dadurch wird die Voraussetzung zur Bindung der Primer geschaffen, die im nächsten Schritt erfolgt. Dazu wird die Temperatur reduziert auf die sogenannte Annealingtemperatur, die für jeden Primer individuell ist und abhängig ist von der Basenkomposition und Kofaktoren wie Magnesium. In dieser Phase „verschmelzen“ die Primer mit den komplementären Abschnitten des Templatemoleküls. Im letzten Schritt der PCR, der Synthesephase erfolgt dann die Verlängerung der Primer beginnend am 3'-Ende, die Polymerase nutzt dabei den Einzelstrang als Vorlage für die komplementäre Anlagerung von Nukleotiden. Durch die zigfache Wiederholung dieser drei Schritte erfolgt die exponentielle Amplifikation, im Optimalfall verdoppelt sich die Menge an Produkt bei jedem Schritt.

Zum qualitativen Nachweis der Expression bestimmter Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit eine so genannte Endpunkt-PCR durchgeführt. Entsprechend des oben beschriebenen Grundprinzips erfolgt der PCR-Lauf über 35 Zyklen. Die Reaktion setzt sich dabei wie folgt zusammen:

5x PCR-Puffer	10 µl
MgCl ₂ (Stock: 25mM)	4 µl
dNTP-Mix (Stock: jeweils 10mM)	1 µl
Primer <i>forward</i> (Stock:10µM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (Stock:10µM)	1 µl
GoTaq® DNA Polymerase	0,25 µl
cDNA (aus RT-Reaktion)	1 µl
H ₂ O	31,75 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Von jeder PCR-Reaktion wurden 20µl im Anschluss an den Lauf auf ein Agarosgel (2 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (100 V für 1 h). Zur Visualisierung der amplifizierten DNA-Moleküle wurden diese anschließend mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Sybr Green in einem Färbebad (TAE mit 1:10000 verdünntem Farbstoff) inkubiert. Der Farbstoff lässt sich mittels kurzweiliger UV-Strahlung anregen und die Moleküle können als Banden im Gel erfasst werden.

Zur Kontrolle der Fragmentgröße wurde stets ein Basenpaarmarker geladen, der sich aus Fragmenten der Größe 100 – 1000 bp (in 100 bp Schritten) zusammensetzt.

3.3.5. Realtime-PCR

Im Gegensatz zur Endpunkt-PCR wird bei einer Realtime-PCR nach jedem Zyklus die Fluoreszenz des Reaktionsansatzes detektiert. Aus den resultierenden Daten kann der sogenannte Ct-Wert (*Cycle threshold*-Wert) bestimmt werden. Diese Zahl ist definiert als der Zyklus der Reaktion, ab der die Fluoreszenzintensität im Ansatz stärker ist als der Hintergrund und sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase befindet.

Voraussetzung für die Detektion ist das Vorhandensein eines Farbstoffs, der in Abhängigkeit von der Produktmenge ein Signal (nach Anregung) erzeugt. Dies kann durch Zugabe von Sybr Green in den Mastermix erfolgen. Je mehr Produkt vorhanden ist, desto mehr Sybr Green kann an DNA binden und desto stärker ist das erzeugte Signal. Eine andere Möglichkeit der Signalgenerierung ist die Verwendung sogenannter TaqMan®-Sonden. Diese Sonden sind kurze Oligonukleotide (analog zu den Primern), die komplementär zu einer Region zwischen den Primern sind. An den Enden der Sonde ist zum einen ein Fluorophor (z.B. 6-Carboxyfluorescein - FAM) und zum anderen ein *Quencher* (z.B. Tetramethylrhodamin – TAMRA) vorhanden. Solange die Sonde intakt ist, befinden sich Fluorophor und *Quencher* in räumlicher Nähe und vom Fluorophor emittierte Signale werden vom *Quencher* abgefangen. Bindet die Sonde jedoch zwischen die Primer, kommt es beim Syntheseschritt zu einer Hydrolyse der Sonde durch die Polymerase und zur Freisetzung von Fluorophor und *Quencher*, woraufhin letzterer seine Funktion einbüßt. Je mehr Produkt also gebildet wird, desto mehr Sonden werden abgebaut und desto mehr Farbstoff wird freigesetzt. Vorteil der Verwendung von TaqMan®-Sonden ist, dass durch die Sonden die Spezifität der Detektion gegenüber einer ausschließlich Primer-basierten qPCR-Reaktion erhöhen. Für diese Arbeit wurden optimierte, kommerzielle TaqMan®-Assays verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

2x TaqMan® <i>Gene Expression Mastermix</i>	10 µl
TaqMan®-Assay	1 µl
cDNA (aus RT-Reaktion)	1 µl
H ₂ O	8 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Die Läufe erfolgten mit den Standardeinstellungen des qPCR-Cyclers (StepOnePlus, Fa. Applied Biosystems) über 40 Zyklen. Jede Reaktion wurde im Triplikat angesetzt

und nur bei Konsistenz der Resultate erfolgte eine Auswertung. Als endogene Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse wurde für alle Proben β -Actin verwendet. Zur Auswertung erfolgte im 1. Schritt die Normalisierung auf die endogene Kontrolle durch Berechnung des ΔCt -Werts für alle Ansätze (z.B. unbehandelt/behandelt):

$$\Delta Ct = Ct_{\beta-Actin} - Ct_{Zielgen}$$

Im 2. Schritt erfolgte die Differenzbildung zwischen „behandelt“ und „unbehandelt“ und die Berechnung des $\Delta\Delta Ct$ -Werts (entspricht x-fach Änderung des Gens gegen „unbehandelt“) nach folgender Formel:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct_{behandelt} - \Delta Ct_{unbehandelt})}$$

Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse, die aus den RNA-Proben der Patienten generiert wurden, erfolgte aufgrund der fehlenden Referenz eine modifizierte Auswertung. Zunächst erfolgte die Berechnung des ΔCt analog der oben angeführten Vorgehensweise. Der errechnete Wert wurde dann Log2 transformiert (2^{Ct}).

3.3.6. qPCR-Array

Bei der Genexpressionsanalyse mittels eines qPCR-Arrays handelt es sich von der Methodik betrachtet um eine normale Realtime-PCR-Analyse. Die Besonderheit liegt darin, dass die 96-Well-Platte (das „Array“) schon mit lyophilisierten Primern gegen zahlreiche Gene bestückt ist. Zusätzlich befinden sich Kontrollen zum Nachweis einer effizienten RT-Reaktion und Kontamination mit genomischer DNA auf der Platte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches Array verwendet, das Primer gegen Gene relevanter Faktoren der TLR-Signalkaskaden enthält. Im Unterschied zur „normalen“ Realtime-PCR wird pro Platte nur eine Probe aufgetragen. Dazu wurden von jeder Probe 500ng RNA mit einem speziellen Kit (RT² First Strand Kit) in cDNA transkribiert. Auch dieses Protokoll beinhaltet zunächst einen Schritt zur Eliminierung genomischer DNA (42 °C für 5 min), bevor die eigentliche RT-Reaktion bei 42 °C für 15 min stattfindet. Nach Ablauf der Reaktion wurden zu den 20 μ l Reaktionsmix 91 μ l H₂O zugegeben. 102 μ l dieses cDNA-Template wurden dann in einem großen Ansatz mit 1350 μ l RT² SYBR® Green qPCR Mastermix und 1248 μ l H₂O vermischt, jeweils 25 μ l des Mastermix mittels Multikanalpipette in jedes Well dispensiert und die Platte mit Folie versiegelt. Zur Beseitigung von Blasen wurde die Platte bei 1.000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der PCR-Lauf wurde im Anschluss über 40 Zyklen durchgeführt und bestand jeweils aus einer Denaturierungsphase (15 s bei 95 °C) und kombinierten Annealing- und Synthesephase (1 min bei 60 °C). Vorgeschaltet erfolgte

die Aktivierung der DNA-Polymerase durch eine initiale Erhitzung der Reaktionen auf 95 °C (10 min).

Nach Ende des Laufs wurden die Ct-Werte aller Wells nach Excel exportiert. Für jede Behandlung (LPS und AGE-BSA) bzw. Kontrolle wurden 3 biologische Replikate analysiert. Dies erfolgte in einer von der Firma bereitgestellten Excel-Vorlage. In diese wurden die Ergebnisse aller Experimente eingetragen und die entsprechenden Veränderungen (*Fold changes*) und Signifikanzen der Veränderung automatisch berechnet sowie die Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Erstellung einer graphischen Auswertung der Daten in Form eines *Volcano Plots* erfolgte ebenfalls in dieser Vorlage; als biologisch relevant wurde eine 2-fache Veränderung (nach oben und unten), als signifikant Veränderungen mit einem p -Wert $< 0,05$ angenommen.

3.4. Durchflusszytometrie

3.4.1. Quantitative Messung der HLA-DR-Expression auf Monozyten

Die Bestimmung der HLA-DR-Expression auf Monozyten erfolgte direkt aus frisch entnommenem Vollblut (< 30 min). Dazu wurden 50 μ l antikoaguliertes Vollblut im FACS-Röhrchen mit 20 μ l des Antikörpercocktails bestehend aus anti-CD14-PerCP-5.5 und anti-HLA-DR-PE für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Beseitigung der Erythrozyten wurden diese im Anschluss durch Zugabe einer hypotonen Lösung (FACS™ Lysing Solution) und folgender 15 minütigen Inkubation bei RT lysiert. Die Besonderheit des im Cocktail vorliegenden Antikörpers gegen HLA-DR ist die Konjugation an das Fluorophor im Verhältnis 1:1. Bindet ein Antikörper an ein HLA-DR-Molekül auf der Zelloberfläche bindet somit auch indirekt ein Molekül Farbstoff. Dieser Zusammenhang ermöglicht die direkte Quantifizierung der durchschnittlichen Anzahl an HLA-DR-Molekülen pro Monozyt. Der im Cocktail vorhandene CD14-Antikörper ermöglicht das eindeutige Gating auf die Monozyten im *Side Scatter* vs. CD14-Plot (Abb.8 D). Von diesen Zellen wurde die Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Färbung als *Geometric Mean* erfasst. Um eine exakte Quantifizierung ohne Beeinflussung durch Tagesvarianzen zur ermöglichen, wurde zu jedem Messzeitpunkt auch eine Eichkurve erstellt. Diese basiert auf der Messung von Beads mit definierten Mengen an gebundenen Farbstoff (4 Populationen). Nach Gating auf die Beads (Abb. 9 A) zeigt sich im Histogramm die Verteilung der Intensitäten (Abb. 9 B). Durch Setzen von Markern wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Populationen als *Geometric Mean* erfasst und in das in der FACS-Steuerungssoftware CellQuest Pro implementierte QuantiQuest-Modul übertragen. Hier werden auch die Lot-spezifischen Farbstoffmoleküle jeder Beadpopulation eingetragen, das Modul generiert dann eine lineare Regression und gibt Güte der Regression (R -Squared = R^2), Steigung (*Slope*)

und Schnittpunkt mit der y-Achse (*Intercept*) aus. Anhand dieser Parameter und der gemessenen Fluoreszenzintensität der Patientenprobe kann die durchschnittliche Anzahl der HLA-DR-Moleküle pro Monozyt berechnet werden.

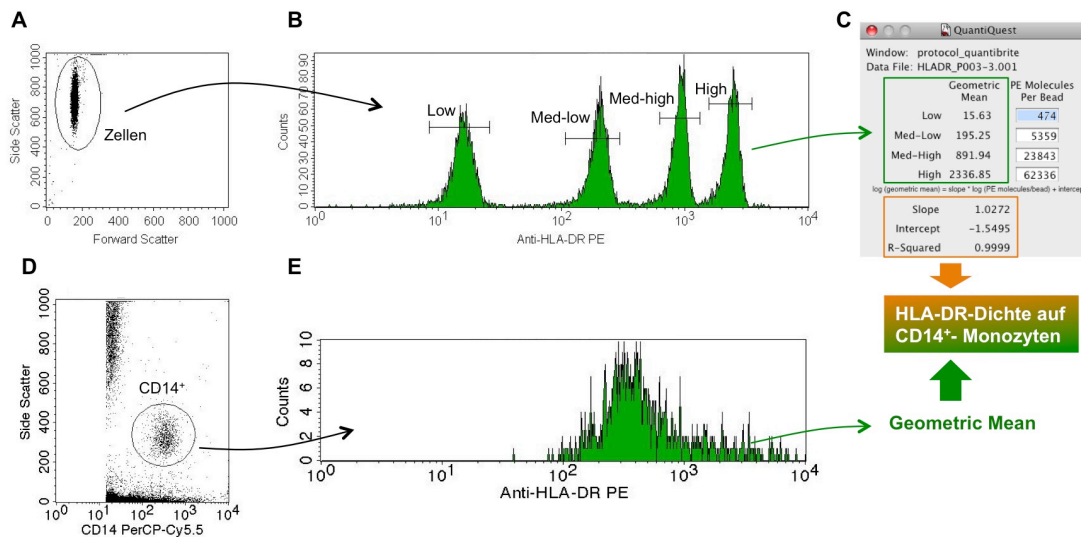


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Protokolls zur Quantifizierung von monozytärem HLA-DR. (A)+(B) Erstellung der Eichkurve mittels definierter Calibrite™ Beads. (D)+(E) Messung der Fluoreszenzintensität nach anti-HLA-DR-Färbung auf CD14⁺-Monozyten und (C) Verrechnung der Messwerte und der Eichkurve.

3.4.2. Quantitative Bestimmung der Proteinexpression

Zur quantitativen Messung der Proteinexpression auf der Zelloberfläche wurde ein Protokoll ähnlich der HLA-DR-Messung etabliert. Voraussetzung für die Vergleichbarkeit war auch hier zum einen die tägliche Erstellung einer Eichkurve zum Ausschluss von Geräte-abhängigen Varianzen und zum anderen die Verwendung von Antikörpern mit gleichbleibendem Antikörper-Fluorophor-Verhältnis über den gesamten Verlauf der Studie. Um dies zu erreichen wurden der Antikörper gegen RAGE und der entsprechende Kontrollantikörper in ausreichender Menge aus der selben Produktionscharge bezogen und von der Herstellerfirma in einem Konjugationsdurchgang an Allophycocyanin gekoppelt. Zwar ist durch dieses Vorgehen nicht klar, wie viele Moleküle APC pro Antikörper gebunden sind, jedoch ist dies für die gesamte Antikörpercharge identisch.

In Analogie zur HLA-DR-Bestimmung erfolgte zu jedem Messzeitpunkt die Erstellung einer Eichkurve aus der Messung der Fluoreszenzintensität von 5 Beadpopulationen mit bekannter Menge an gekoppelten Fluorophormolekülen (Abb. 10 A+B). Im Gegensatz zur HLA-DR-Bestimmung erfolgt die Angabe nicht direkt in Molekülen pro Bead sondern in der Äquivalenzeinheit MESF (*Molecules of equivalent soluble fluorophore*). Die Verrechnung der Fluoreszenzintensität des RAGE- bzw. Isotyp-Antikörpers mit der Eichkurve erfolgt unter Zuhilfenahme einer von der Herstellerfirma

der Beads bereitgestellten Excel-Vorlage (QuickCal Version 2.3). Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der Beadpopulationen und der Messungen in die Vorlage übertragen und nach linearer Regression der Eichkurve die Werte automatisiert berechnet. Die Messwerte werden als MESF pro Zelle ausgedrückt. Das Gating auf CD14⁺-Monozyten erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.3 beschrieben.

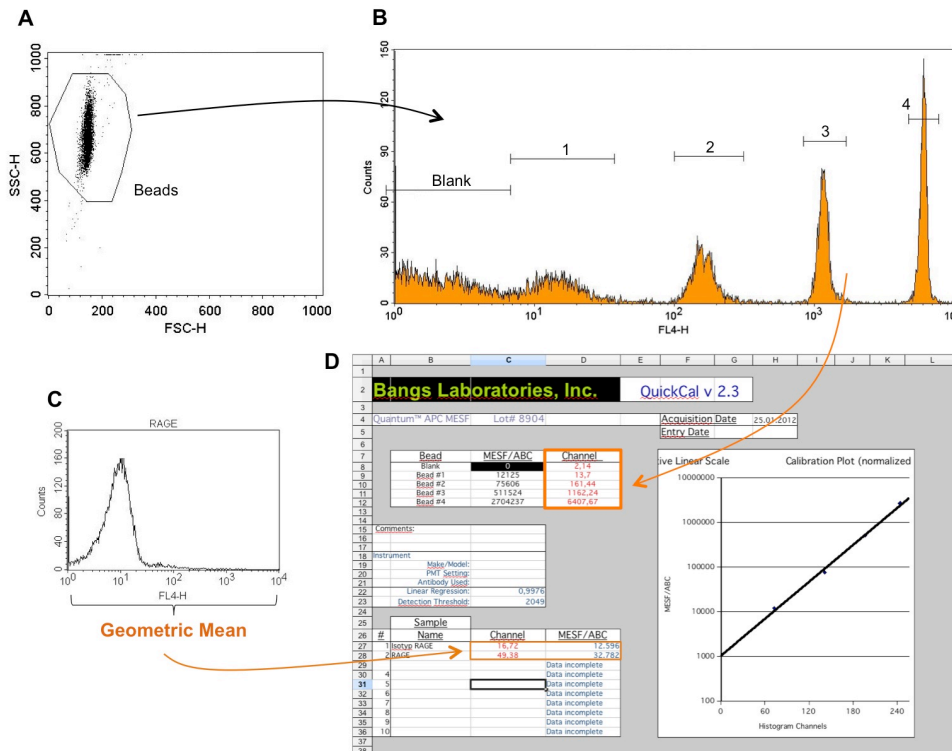


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Protokolls zur quantitativen Bestimmung der RAGE-Oberflächenexpression. (A)+(B) Erstellung der Eichkurve mittels definierter Quantum™ MESF Beads. Die gemessene Fluoreszenzintensität (C) wurde gegen die Eichkurve kalibriert (D).

3.4.3. Messung von Oberflächenmarkern

Zur Analyse der Expression von Zelloberflächenproteinen wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern markiert. Die optimale Konzentration wurde durch Titrierung des Antikörpers empirisch ermittelt. Um unspezifische Bindungen an die Fc-Rezeptoren der Monozyten und damit der Generierung eines falsch-positiven Signals vorzubeugen, wurden sowohl Zellkulturzellen als auch Vollblut vor Zugabe der Antikörper mit einer Fc-Rezeptor-blockierenden Substanz vorinkubiert (TruStain Fx). Dazu erfolgte die Zugabe von 10 µl zu 100 µl Vollblut bzw. Zellsuspension. Im Falle der Zellkulturzellen wurden jeweils 250.000 Zellen pro Analyse eingesetzt. Die anschließende Färbung der Zellen erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Um bei der Analyse des Vollblutes klar die Monozyten identifizieren zu können, wurde immer eine Zweitfärbung mit CD14-FITC durchgeführt. Nach Inkubation wurden die Zellkulturzellen mit 1 ml PBS-BSA (0,5 %) resuspendiert, und 2x gewaschen. Die Zentrifugation

zwischen den Schritten erfolgte bei 250 x g für 5 min. Danach wurden die Zellen in 250 µl PBS resuspendiert und direkt gemessen. Im Falle des Vollblutes war vor Analyse noch die Lyse der Erythrozyten notwendig. Dazu wurden dem Ansatz 2 ml hypotone Lyselösung zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte ein 2maliges Waschen wie bei den Zellkulturzellen vor der endgültigen Messung. Monozyten wurden im Falle des Vollblutes aufgrund ihrer *Forward Scatter* (FSC)-*Side Scatter* (SSC)-Eigenschaften und der Expression von CD14 identifiziert und gated (Abb. 11 A). Bei Proben mit Zellkulturzellen wurde auf Basis der FSC-SSC-Eigenschaften auf zelluläre Events gated, um Debris und Aggregate auszuschließen (Abb.11, linke Grafik). Pro Messung wurden 5.000 Events im Gate „CD14⁺“ bzw. „Zellen“ erfasst. Die Auswertung erfolgt im Falle der Patientenproben als „% positive Zellen“ über Isotyp und quantitativ als *Geometric Mean* der Fluoreszenzintensität zur Verrechnung mit der Eichkurve.

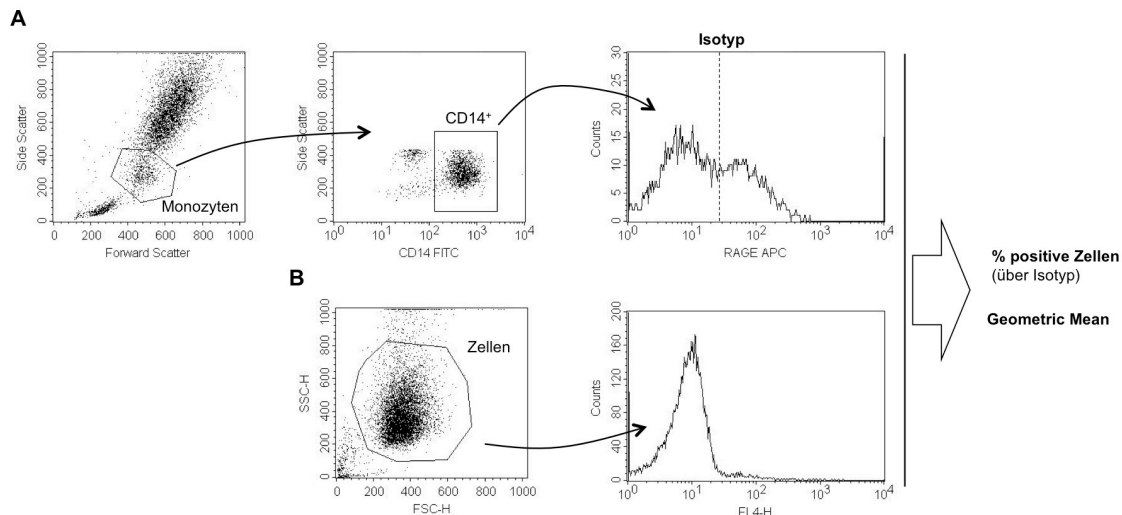


Abbildung 11: Gating-Strategie bei der Analyse von Oberflächemarkern. (A) Vollblut und (B) Mono Mac-6-Zellen.

3.4.4. intrazelluläre Färbung von TNF-α

Um die intrazellulären Epitope der Protein für Antikörper zugänglich zu machen, bedarf es einer initialen Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Zudem muss im Falle von Proteinen, die auf der Zellmembran lokalisiert werden bzw. eine Sekretion vorgesehen ist, der Transport unterbrochen werden. Dies geschieht durch Zugabe eines Inhibitors des Golgiapparats (BD GolgiStop™, 0,66 µl/ml Zellsuspension) zeitgleich mit der 2. Stimulation im Rahmen der Doppelstimulationsexperimente.

Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 250 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung zu den pelletierten Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen) mit nachfolgender Inkubation für 20 min bei 4 °C. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit jeweils 1 ml Perm/Wash™-Puffer, die Zentrifugation zwischen

den Schritten erfolgte bei 250 x g für 5 min. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 50 µl Puffer resuspendiert und mit dem spezifischen Antikörper bzw. dem Isotypantikörper für weitere 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneutes, zweimaliges Waschen der Zellen mit 1 ml Puffer und die Aufnahme in 250 µl Puffer zur nachfolgenden Messung im Durchflusszytometer. Das Gating erfolgte analog zum Vorgehen bei Oberflächenfärbungen (Abb.11 B), das Ergebnis wird als „% positive Zellen“ im Vergleich zur Isotypfärbung ausgedrückt.

3.4.5. Analyse des Zellzyklus

Als Zellzyklus wird die Abfolge der Phasen bezeichnet, in denen die Voraussetzung zur mitotischen Teilung der Zelle und schließlich die Teilung selbst erfolgt. Ein elementarer Schritt dabei ist die Replikation des Genoms, vom diploiden Zustand in der G0/1-Phase zum tetraploiden Zustand nach der (Neu-) Synthese (S-Phase) in der G2-Phase kurz vor Teilung. Die Verteilung der Zellpopulation über die Phasen kann durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid und Messung im Durchflusszytometer erfasst werden. Um die Färbung zu ermöglichen, müssen die Zellen fixiert und die Membran dadurch permeabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Unter ständigem Vortexen erfolgte dann die tröpfchenweise Zugabe von 700 µl eiskaltem Ethanol (100 %, -20°C) zur Zellsuspension und die Inkubation für mindestens 1 h bei -20 °C. Daraufgehend wurde das Ethanol nach Zentrifugation (250 x g, 5 min, 4 °C) entfernt, die Zellen zweimal in jeweils 1 ml PBS gewaschen und in 250 µl PBS (RT) resuspendiert. Der Verdau der intrazellulären RNA wurde durch die Zugabe von RNase A (200 µg/ml Endkonzentration) und einer Inkubation für 30 min bei 37 °C erreicht. Dieser Schritt ist vor der Färbung notwendig, da PI gleichermaßen RNA als auch DNA bindet und so unspezifische Fluoreszenzsignale generieren würde. Zur Anfärbung der DNA wurde PI in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen dann im Durchflusszytometer gemessen. Aufgrund der Fixierung kommt es zur Bildung von Zellaggregaten, die vor der Analyse über Gating ausgeschlossen werden müssen. Dazu erfolgt ein grobes Gating der Zellen anhand der FSC-SSC-Darstellung (Abb.12 A). Das Durchflusszytometer war entsprechend eingestellt, um im Fluoreszenzkanal 2 sowohl Breite als auch Fläche des Signals mit linearer Skala zu erfassen (FL2-W bzw. -A). Die grafische Darstellung von FL2-A vs. FL2-W ermöglicht den Ausschluss von Aggregaten durch Anlegen eines nierenförmigen Gates („Singletts“, Abb.12 B). Die Vorspannung der Photomultiplier wurde so angepasst, dass sich Zellen in der G0/1-Phase im Bereich von 200 im FL2-A-Kanal darstellten. In der Histogrammdarstellung des FL2-A-Kanals konnte man die Phasen des Zellzyklus

mittels Marker abgrenzen. Aufgrund der Einstellung der G0/1-Phase auf 200 und der linearen Darstellung bilden sich die Zellen in der G2-Phase mit doppelt so hoher Fluoreszenz bei 400 ab. Von jeder Probe wurden 5.000 Events im „Singletts“-Gate erfasst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gatingstrategie so gewählt, dass keine apoptotischen Zellen (Genom < 2 n aufgrund Caspase-induzierter Fragmentierung) mit dieser Methode erfasst werden können, da die Bestimmung der Apoptose und Nekroserate mit separater Methodik erfolgte.

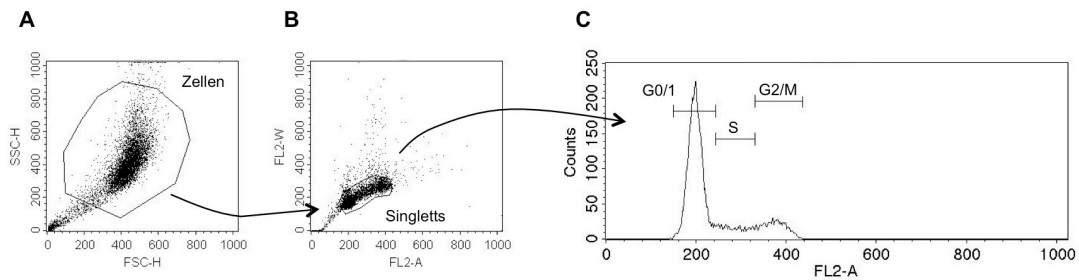


Abbildung 12: Gating-Strategie bei der Analyse des Zellzyklus. (A) Gating auf zelluläre Events, (B) Ausschluss der Zellaggregate, (C) Darstellung des Zellzyklus als Histogramm der Fluoreszenzverteilung im linear skalierten FL2-Kanal, Marker definierten einzelne Zyklusphasen.

3.4.6. Erfassung der Apoptose- und Nekroserate

Nekrose und Apoptose sind zwei Arten des Zelluntergangs, die sich in verschiedenen Eigenschaften unterscheiden. Nekrose zeichnet sich durch an Anschwellen der Zellen, dem frühen Integritätsverlust der Zellmembran und der Freisetzung endogener Bestandteile aus. Im Gegensatz dazu schrumpfen die Zellen bei apoptotischem Zelltod unter Abschnürung von Vesikeln, sogenannter *apoptotic bodies*. Auch die Zellmembran behält bis zuletzt ihre Integrität, es kommt jedoch früh zu strukturellen Veränderungen, z.B. translozieren Phosphatidylserine, die sich normalerweise ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran befinden, auf die Außenseite. Zur Analyse des Zelltodes werden die Membraneigenschaften genutzt. Das Phosphatidylserin-bindende Annexin V (mit konjugiertem Farbstoff) wird zur Erkennung von frühapoptotischen Zellen benutzt. Außerdem kommt wieder die Eigenschaft von Propidiumiodid zum Einsatz, an Nukleinsäuren zu binden. Die Zellen werden für die Zelltodanalyse im Gegensatz zur Analyse des Zellzyklus nicht fixiert. Nur Zellen mit Verlust der Membranintegrität nehmen daher das PI auf und erzeugen ein Signal.

Die Färbung der Zellen erfolgte schrittweise. Jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden je einmal mit 1 ml PBS und Annexin V-Bindepuffer (1x) gewaschen und in 100 μ l Bindepuffer resuspendiert. Der Bindepuffer ist notwendig, da dieser Ca^{2+} -Ionen enthält, welche für die Interaktion von Annexin V mit Phosphatidylserin essentiell sind. Nach Zugabe von 5 μ l von Annexin V-APC wurde die Suspension für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert,

die Zellen danach einmal mit Bindepuffer (1 ml) gewaschen und resuspendiert (200 µl). Hierzu wurde die Propidiumiodidlösung pipettiert und nach 5min Inkubation gemessen. Die Erfassung von Annexin V erfolgte aufgrund des konjugierten Farbstoffs APC im Kanal FL4, während PI im Kanal FL2 detektiert wurde. Das Gating erfolgte auch hier zunächst grob auf zelluläre Events, die Auswertung durch Darstellung im Dotplot (FL2 vs. FL4) (Abb. 13). Die Zellen wurden unterschieden in lebendig (PI^- Annexin V^-), Frühapoptose (PI^- Annexin V^+), tot (PI^+ Annexin V^+) und PI^+ (PI^+ Annexin V^-). Bei letzterer Gruppe handelt es sich um eine unspezifische Anfärbung möglicherweise aufgrund von Membrantransportern. Die Analyse erfolgte durch Einteilung in Quadranten, orientiert an den Grenzen von Einzelfärbungen.

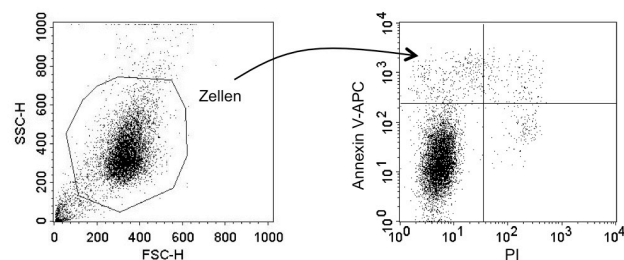


Abbildung 13: Gating-Strategie bei der Erfassung der Apoptose- und Nekroserate.

3.4.7. Qualitätskontrolle der Monozytenisolation

Um die Effizienz bzw. Reinheit der Monozytenisolation zu ermitteln, wurden vor und nach der Isolation geringe Mengen der Zellsuspension im Durchflusszytometer gemessen. Die Evaluierung der Effizienz erfolgte im direkten Vergleich der beiden Proben anhand der FSC-SSC-Eigenschaften der Zellen. Nach Ficoll-Zentrifugation zeigten sich markante Lymphozyten- und Monozytenpopulationen (Abb.14 A) und nur wenige Events im hohen SSC-Bereich, was auf eine effiziente Entfernung der neutrophilen Granulozyten hinweist. Ein Verschwinden der Lymphozytenpopulation war abschließend Indikator der erfolgreichen Anreicherung der Monozyten (Abb.14 B).

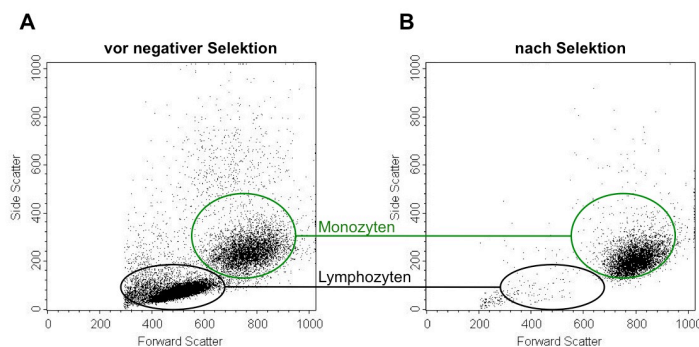


Abbildung 14: Vergleich der Zellverteilung vor (A) und nach Selektion der Monozyten (B) anhand der FSC-SSC-Eigenschaften.

3.4.8. Zytokinbestimmung mittels *Cytometric Bead Array*

Die *Cytometric Bead Array*-Methode ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyte aus einer Probe mit geringem Volumen (50 µl). Für diese Arbeit wurden verschiedene Zytokine quantifiziert.

Die Multiplex-Methode basiert ähnlich eines *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) auf der Bindung zweier Antikörper an das zu untersuchende Analyt. Dabei ist der 1. Antikörper, der *Capture*-Antikörper, kovalent an Beads gebunden. Für jedes zu untersuchende Analyt besitzen die entsprechenden Beads eine definierte Fluoreszenz (hier: APC), um sie später in der Analyse zu unterscheiden. Der *Detector*-Antikörper wiederum ist an einen weiteren Farbstoff gebunden (PE). Bei Inkubation der Beads mit verschiedenen Analytspezifitäten mit der zu untersuchenden Probe und einem äquimolaren Mix der *Detector*-Antikörper (Abb.15 A), binden die Antikörper der Beads das jeweilige Analyt, welches wiederum auch von den *Detector*-Antikörpern gebunden wird. Es entstehen so Bead-Antikörper-Analyt-Antikörper-Komplexe (Abb. 15 B). Zur Analyse werden zunächst die einzelnen Beadpopulationen anhand ihrer Fluoreszenzintensität im FL4-Kanal unterschieden und die Intensität im FL2-Kanal gemessen. Letztere ist proportional zum gebundenen Analyt, die Konzentrationsbestimmung kann nachfolgend gegen die Verrechnung mit einer Eichkurve erfolgen.

Zur Durchführung der Messung wurden je Probe 10 µl jedes Capture-Beads (*Human Inflammatory Cytokine Kit*) gemischt und 50 µl in ein FACS-Röhrchen vorgelegt. Vorab wurde der lyophilisierte Multianalyt-Standard rekonstituiert und seriell jeweils 1:1 verdünnt. Insgesamt wurden 9 Standards verwendet (und Leerwert), die einen Bereich von 20-5000 pg/ml umfassen. Zu den vorgelegten Beads wurden jeweils 50 µl des jeweiligen Standards oder der Probe pipettiert, zusätzlich erfolgte die Zugabe des *Detector*-Antikörper-Cocktails. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die Beads einmal gewaschen. Dazu wurde 1 ml Waschpuffer zugegeben und die Röhrchen bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Beads in 200 µl neuem Waschpuffer resuspendiert.

Die Messung erfolgte ohne Kompensation und nach Kalibrierung des Instruments mit den mitgelieferten Kontrollbeads. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software FCAP™ Array.

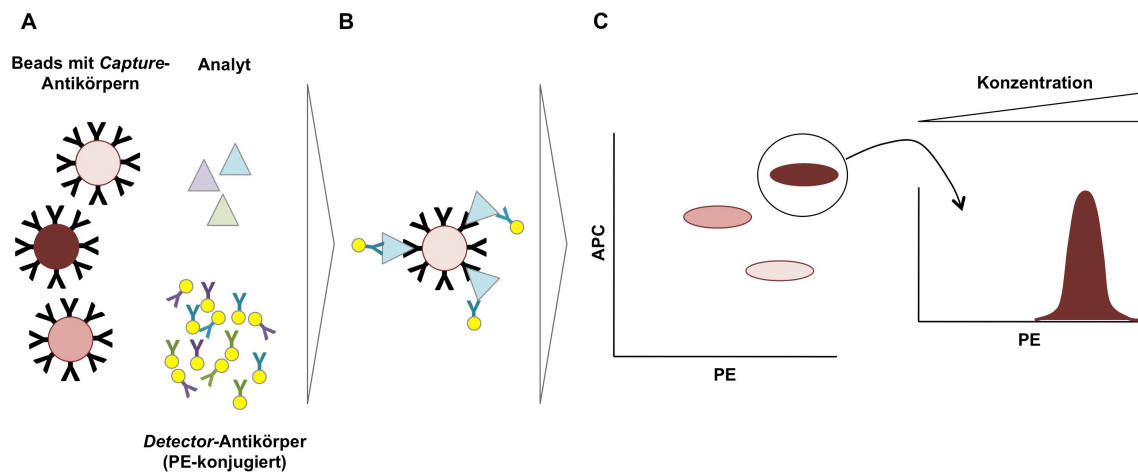


Abbildung 15: Schematischer Ablauf der Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array. (A) Inkubation der Beads mit Probe und Detector-Antikörper und (B) Komplexbindung. (C) Unterscheidung der Beadpopulationen im Kanal FL4 (APC), Fluoreszenz im FL2-Kanal proportional zur Menge an gebundenen Detektorantikörper und damit zum gebundenen Analyt. Grafik modifiziert nach Herstellerhomepage (BD Biosciences).

3.5. ELISA

Zur Quantifizierung von Proteinen (oder anderer Makromoleküle) in Lösung ist die ELISA-Methode der weitverbreitete Goldstandard. Wie das CBA sind jedoch auch ELISA abhängig von der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten des ELISA: Sandwich- und kompetitiver ELISA. Der Sandwich-ELISA funktioniert analog zum CBA mittels eines *Capture*- und eines *Detector*-Antikörpers. Der *Capture*-Antikörper ist in diesem Fall jedoch nicht an Beads gekoppelt, sondern an der Plastikoberfläche einer 96-Well-Platte. Die Proben werden in die Vertiefungen gegeben und nach Inkubation und stringentem, mehrmaligen Waschen wird der *Detector*-Antikörper zugegeben. Dieser ist im Falle des ELISA nicht an ein Fluorophor gekoppelt, sondern an ein Enzym, in der Regel *Horseradish Peroxidase* (HRP). Alternativ kann der Antikörper auch an Biotin gekoppelt sein, dann muss in einem weiteren Schritt Streptavidin-gekoppeltes HRP zugegeben werden. Die Detektion basiert bei allen in dieser Arbeit verwendeten ELISAs auf einem Farbumschlag, der durch Umwandlung eines farblosen Substrats durch HRP hervorgerufen wird. Die Stärke des Farbumschlags ist proportional zur vorhandenen Menge an HRP und damit gebundenem Antikörper bzw. Analyt. Die Konzentration wird auch bei dieser Methode durch Verrechnung gegen eine Eichkurve bestimmt.

Beim kompetitiven ELISA ist ebenfalls der *Capture*-Antikörper in den Wells gebunden, die Detektion erfolgt aber indirekt. Dazu wird zusätzlich zur Probe eine definierte Menge eines Antigens eingesetzt, dass ebenfalls durch den Antikörper erkannt und gebunden wird und somit mit dem in der Probe vorhandenen Analyt kompetiert. Das Antigen ist hierbei an HRP gekoppelt, wodurch der Farbumschlag resultiert. Im

Gegensatz zum Sandwich-ELISA ist der Farbumschlag hier jedoch umso schwächer, je mehr Analyt in der Probe vorhanden ist, da das HRP-gekoppelte Antigen stöchiometrisch von den *Capture*-Antikörpern verdrängt und durch Waschen entfernt wird. Vorteilhaft ist das kompetitive ELISA bei Analyten mit nur einem antigenen Epitop (z.B. sehr kleine Proteine).

Das Waschen der Platten erfolgte stets durch einen automatisierten Waschautomaten, die Inkubationszeiten richteten sich nach den Herstellerangaben. Die Proben wurden jeweils doppelt gemessen, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen bzw. –fehler zu erkennen. Im Rahmen der Arbeit wurden sowohl Sandwich- als auch kompetitive ELISA verwendet. Im Falle von TNF- α wurden die ELISA-Platten selbst mit *Capture*-Antikörper gecoaed. Dies erfolgte am Vortag der Messung, mit Inkubation der Antikörperlösung über Nacht. Nach Waschen wurde das Assay wie bei den vorbereiteten Platten durchgeführt.

Die Konzentrationsbereiche der verschiedenen Analyte unterscheiden sich grundlegend, die Konzentrationen sind daher in folgenden Einheiten angegeben:

sRAGE	$\frac{pg}{ml}$
esRAGE	$\frac{ng}{ml}$
Zytokine	$\frac{pg}{ml}$
HMGB1	$\frac{ng}{ml}$
AGE-modifizierte Proteine	$\frac{\mu g}{ml}$
CML-modifizierte Proteine	$\frac{\mu g}{ml}$
MG-modifizierte Proteine	$\frac{\mu g}{ml}$
S100A8	$\frac{ng}{ml}$
S100A12	$\frac{ng}{ml}$

3.6. Qualitativer Nachweis von Zytokinen mittels Membran-basiertem Proteinarray

Die Charakterisierung der globalen Zytokinproduktion von MonoMac-6-Zellen auf eine Stimulation mit LPS und AGE-BSA erfolgte mittels eines Membran-basierten Proteinarrays (Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Panel A, R&D Systems). Nach 24-stündiger Stimulation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und verbliebene Zellen bei einer Zentrifugation für 5 min bei 300 x g entfernt. Überstände von drei

unabhängigen Experimenten wurden vereinigt und jeweils 1ml des Überstands mit 500 µl Pufferlösung (Buffer 4) verdünnt. Nach Zugabe von 15 µl des Detektionsantikörper-Cocktails wurden die Proben für 1 h bei RT inkubiert und anschließend auf die mit Puffer prä-inkubierte Membran (1h) gegeben. Die Inkubation erfolgte dann für 18 h bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Membranen insgesamt 3x in Waschpuffer für jeweils 10 min schüttelnd gewaschen. Danach wurden jeweils 2 ml einer verdünnten Streptavidin-HRP-Lösung auf die Membranen gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Detektion der Analyte basiert bei dieser Methode auf der Emission von Photonen durch Umwandlung eines Luminol-haltigen Substrats durch das Enzym HRP (welches auch bei der colorimetrischen Detektion des ELISA Anwendung findet). Das Substrat (1 ml) wurde auf die Membran gegeben und nach einer Inkubationszeit von einer Minute entfernt. Die Signalerfassung erfolgt in einem digitalen Chemilumineszenzimager mit gekühlter CCD-Kamera, die Belichtungszeit für das optimale Hintergrund-Signal-Verhältnis wurde durch die Steuerungssoftware des Systems bestimmt.

3.7. Statistik

Die Erstellung der Grafiken erfolgte entweder in Excel (*in vitro*- Experimente) oder in SPSS (Studienergebnisse). Balkendiagramme stellen, sofern nicht anders angegeben, den Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts dar. Boxplots repräsentieren 25. und 75. Perzentile (unterer bzw. oberer Rand der Box) und den Median. Whisker umspannen das Konfidenzintervall (5-95 %) bzw. Minimal- und Maximalwert.

Die statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen Graphpad Prism (*in vitro*- Experimente) und SPSS (Studienergebnisse). Zum Vergleich der Gruppen wurden verschiedene Verfahren angewendet, je nach Gruppengröße und Varianzhomogenität. Beim Vergleich von 2 Gruppen kam sowohl der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz, als auch der *Student's* t-Test für verbundene Stichproben. Bei Mehrfachvergleichen wurde das einfaktorielle Analysis of Variance-Verfahren (ANOVA) verwendet. Bei globaler Signifikanz wurde in Abhängigkeit von der Varianzeigenschaft der Populationen (homogen oder inhomogen), die Bonferroni- bzw. Dunnet-Prozedur für die Einzelvergleiche ausgewertet. Bei Messwerten der gleichen Grundgesamtheit (z.B. unterschiedlich stimulierte Ansätze einer Zellkulturpassage), wurde das ANOVA-Verfahren für Messwertwiederholungen eingesetzt.

Korrelationen wurden mittels des Spearman-Rho-Rangkorrelationskoeffizienten untersucht, da dieses Verfahren aufgrund seiner nicht-parametrischen Eigenschaft

keine Linearitätsannahmen zwischen den Faktoren benötigt und sich robust verhält gegenüber Ausreißern.

4. Ergebnisse

4.1. Retrospektive Analyse von plasmatischen RAGE-Isoformen in einer Biobankkohorte von Traumapatienten

4.1.1. Demographie der Kohorte

Tabelle 1: Demographische Merkmale der untersuchten Studienkohorte. Werte entweder in Anzahl (%) oder Mittelwert (Bereich) angegeben.

Anzahl der Patienten	77	(100)
Geschlecht		
männlich	51	(66,2)
Alter (Jahren)	36,8	(18-80)
Körpergröße (cm)	175,5	(159-190)
Gewicht (kg)	78,5	(48-120)
Vorerkrankungen		
Diabetes mellitus	2	(2,6)
NYHA-Klasse $\geq$ II	2	(2,6)
Arterielle Hypertonie	6	(7,8)
KHK	3	(3,9)
Niereninsuffizienz	1	(1,3)
Leberzirrhose	3	(3,9)
Vorherige Krebserkrankung	1	(1,3)
Ursache der Verletzung		
Autounfall	51	(66,2)
Motorradunfall	9	(11,7)
Unfall als Fußgänger	5	(6,5)
Sturz	7	(9,1)
Unbekannt o. andere Ursache	5	(6,5)
Verletzungen		
Extremitätenfraktur	62	(80,5)
Fraktur des Achsenskeletts	55	(71,4)
Abdominaltrauma	42	(54,5)
Thoraxtrauma	68	(88,3)
Kopfverletzung	61	(79,2)
ISS		
gesamt	77	50,1 (17-75)
Survivor	64	49,6 (17-75)
Non-survivor	13	52,8 (38-75)
Gesamtsterblichkeit (Tag 28)	13	16,9

4.1.2. Zeitlicher Verlauf der RAGE- und IL-6- Konzentrationen nach schwerem Trauma

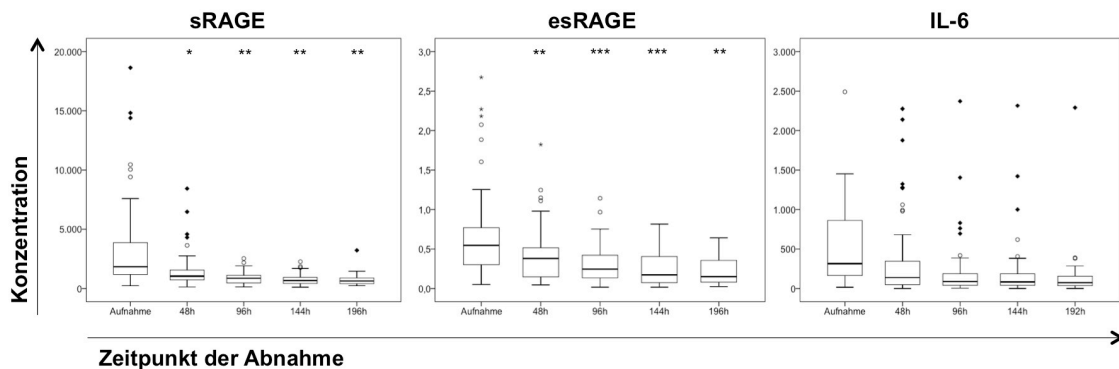


Abbildung 16: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung. Konzentration von sRAGE und IL-6 in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf den Wert bei Aufnahme. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Nach Aufnahme in die Klinik konnten im Plasma der Patienten im Median erhöhte Werte sowohl bei sRAGE (2059,8 pg/ml; IQR: 1300,8-4085,4 pg/ml) als auch bei esRAGE (0,6 ng/ml; IQR: 0,355-0,823 ng/ml) gemessen werden, die jedoch schon 48h später und über den restlichen Beobachtungszeitraum signifikant reduziert waren (Abb. 16 linke und mittlere Grafik). Im Vergleich zu Studien bei denen gesunde Probanden als Vergleichskollektiv herangezogen wurden, sind diese Werte nicht nur im zeitlichen Verlauf sondern auch absolut bei Aufnahme erhöht. Für sRAGE zeigen Bopp *et al.* einen Mittelwert ($\pm$ SD) von 1026 ± 127 pg/ml ($n=8$) (82) und Tan *et al.* einen Median von 1002,6 pg/ml (IQR: 726,5-1345,3 pg/ml) ($n=150$) (88). Für esRAGE geben die Entwickler des ELISA in der zugehörigen Publikation einen Mittelwert von $0,1 \pm 0,05$ ng/ml ($n=55$) für gesunde Probanden an (89). Auch im Fall des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 sind die Werte schon bei Aufnahme deutlich über Normalniveau ($C_{IL-6} \leq 10$ pg/ml; Referenzwert Zentrallabor UKGM Gießen), aufgrund der großen Streuung kommt es aber im zeitlichen Verlauf zu keiner signifikanten Veränderung trotz eines erkennbaren Trends (Abb. 16, rechte Grafik).

Zusammenfassend zeigt die untersuchte Kohorte schon in einer Frühphase nach Traumatisierung ein charakteristisches SIRS transientser Natur welches mit einer ebenfalls transienten Präsenz löslicher RAGE-Isoformen im Plasma einhergeht.

4.1.3. Zeitlicher Verlauf der RAGE-Konzentrationen im Vergleich zwischen Überlebenden und Nicht-Überlebenden

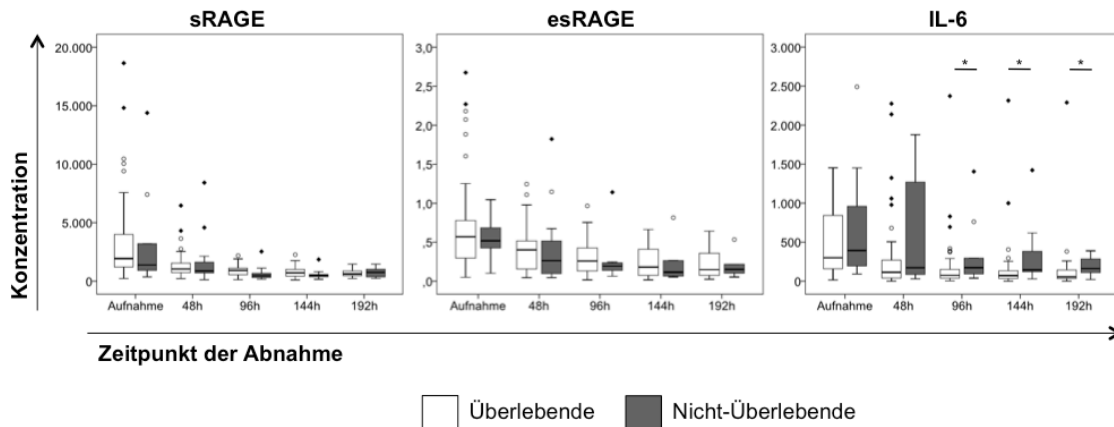


Abbildung 17: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung, gruppiert nach Outcome. Konzentration von sRAGE und IL-6 in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich auf Überlebende vs. Nicht-Überlebende zum jeweiligen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, in wie weit die Parameter sRAGE, esRAGE und IL-6 als prognostische Biomarker nutzbar sind, wurde die Kohorte entsprechend des Überlebens an Tag 28 gruppiert und zu jedem Zeitpunkt die Plasmaspiegel verglichen. Weder sRAGE noch esRAGE zeigen zu irgendeinem Zeitpunkt eine Diskriminationsfähigkeit zwischen den Gruppen „Überlebende“ und „Nicht-Überlebende“ (Abb.17 linke und mittlere Grafik). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Plasmaspiegel von IL-6 beginnend 96 h nach Trauma bis zum Ende des Beobachtungszeitraums signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 17, rechte Grafik). Eine persistierende oder spät nach Trauma auftretende Entzündungsreaktion ist somit mit einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert.

4.1.4. Zeitlicher Verlauf der RAGE- und IL-6 Konzentrationen gruppiert nach Verletzungsschwere

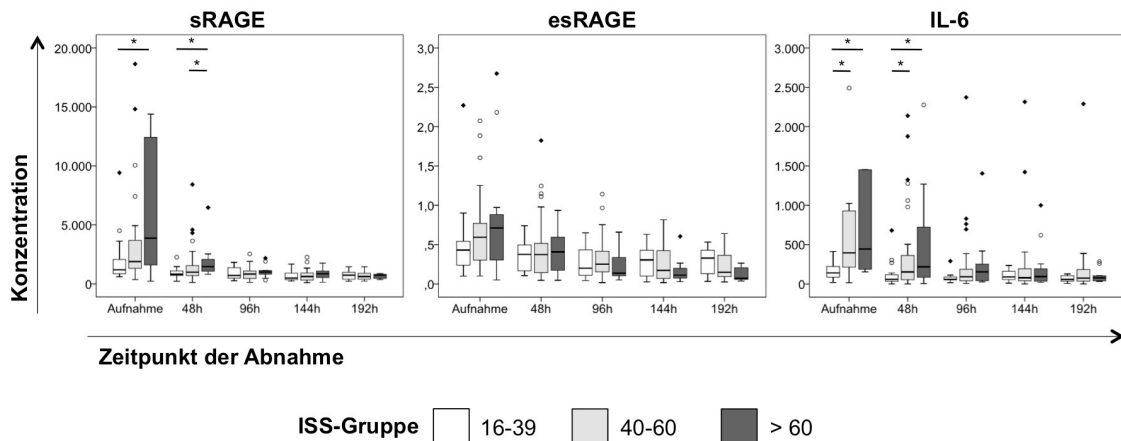


Abbildung 18: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung, gruppiert nach Schweregrad der Verletzung. Einteilung erfolgte mittels des *Injury Severity Scores* (ISS) in 3 Gruppen. Konzentration von sRAGE und IL-6 in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. *: $p < 0,05$.

Je schwerer die Verletzung, desto umfangreicher das Maß an zerstörtem Gewebe und damit die Freisetzung von Zellbestandteilen. Um zu untersuchen, in wie weit die drei untersuchten Parameter von der Verletzungsschwere beeinflusst werden, wurde die Kohorte entsprechend ihres ISS in drei Gruppen eingeteilt (leicht: 16-39; mittel: 40-60; schwer: >60) und die Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten verglichen. Im Vergleich zur Gruppe mit der niedrigsten Verletzungsschwere zeigt die Gruppe der Schwersttraumatisierten signifikant höhere Spiegel an sRAGE und IL-6 sowohl bei Aufnahme als auch 48 h später (Abb.18, linke und rechte Grafik). Während sRAGE zudem zum Zeitpunkt „48h“ signifikant unterscheidet zwischen der mittleren und der hohen Gruppe diskriminiert IL-6 sowohl bei „Aufnahme“ als auch zum Zeitpunkt „48h“ signifikant zwischen den Patienten mit leichter und mittlerer Verletzungsschwere. Es scheint damit ein Zusammenhang zu bestehen zwischen dem Grad des SIRS und der Verletzungsschwere, erkennbar an den Unterschieden der IL-6-Konzentrationen. Zudem zeigen Patienten mit hohem Verletzungsgrad höhere Plasmaspiegel an sRAGE. Der Parameter esRAGE zeigt zu keinem Zeitpunkt zwischen den ISS-Gruppen einen Unterschied (Abb.18, mittlere Grafik). Eine umfangreiche Verletzung induziert somit sowohl eine starke Immunreaktion als auch die Entstehung von löslichem RAGE. Unter Berücksichtigung der gleichbleibenden Konzentrationen von esRAGE liegt nahe, dass die Entstehung des plasmatischen sRAGE entweder durch proteolytische Prozesse auf der Zellmembran oder einer passiven Freisetzung nach Zellerstörung erfolgt.

4.1.5. Korrelation der RAGE-Isoformen untereinander und mit IL-6

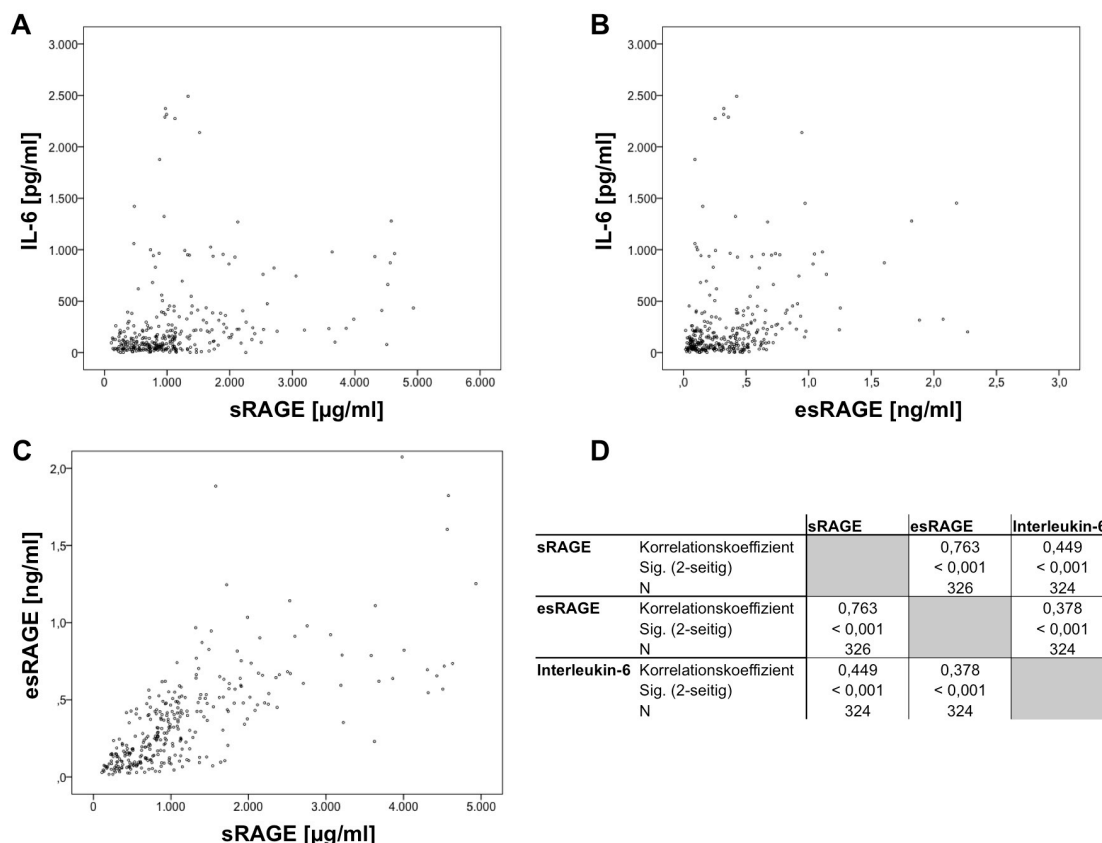


Abbildung 19: Korrelation der Plasmakonzentrationen der RAGE-Isoformen und IL-6. Wertepaare über alle Zeitpunkte wurden für die Analyse zusammengefasst (n=324 bzw. 326) und mittels Streudiagrammen visualisiert. (A) sRAGE vs. IL-6, (B) esRAGE vs. IL-6, (C) sRAGE vs. esRAGE. Statistische Analyse der Korrelation erfolgte mittels des *Spearman-Rho*-Tests, Ergebnisse der Analyse sind in der Tabelle zusammengefasst (D). Sig.: Signifikanzniveau.

Um die Beziehung zwischen den drei Parametern besser beurteilen zu können, wurden die Plasmaspiegel der beiden löslichen Isoformen untereinander und jeweils unabhängig mit IL-6 korreliert. Für die Analyse wurden die jeweiligen Wertepaare über alle Zeitpunkte verwendet, um den Stichprobenumfang zu maximieren (n=324 bei Analysen gegen IL-6 und n=326 bei sRAGE vs. esRAGE). Während zwischen sRAGE (Abb. 19 A) bzw. esRAGE (Abb. 19 B) und IL-6 nur eine schwache, jedoch statistisch hochsignifikante Korrelation besteht ($\rho=0,449$ bzw. $0,378$) zeigt die Analyse von sRAGE mit esRAGE (Abb. 19C) eine starke, hochsignifikante Korrelation ($\rho=0,763$).

Während es sich bei esRAGE um eine alternative Spleißvariante des Gentranskripts handelt, die nach Translation unmittelbar aus der Zelle freigesetzt wird, so setzt sich der Pool des löslichen RAGE (sRAGE) sowohl aus den esRAGE-Molekülen, als auch durch proteolytische Prozesse membranständiger Metalloproteasen von der Zellmembran stammenden oder durch nekrotischen Zelltod freigesetzten Rezeptorfragmenten zusammen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen

Entstehungsmechanismen, die somit beteiligt sind, ist der hohe Grad der Korrelation zwischen den Konzentration der Isoformen umso bemerkenswerter und legt eine ähnliche Funktion nahe.

4.1.6. RAGE- und IL-6- Konzentrationen unmittelbar nach Trauma im Vergleich von Patienten mit und ohne Thoraxverletzung

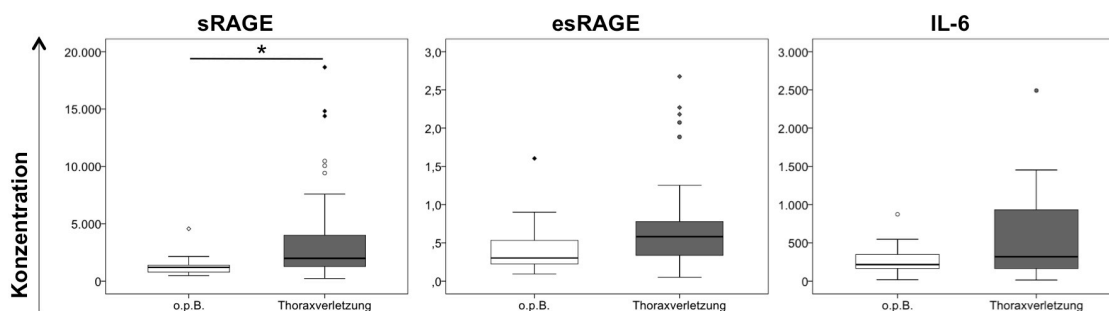


Abbildung 20: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 bei Aufnahme, gruppiert nach Vorliegen einer Thoraxverletzung. Einteilung erfolgte nach Verletzungsdiagnostik in die Gruppe ohne (o.p.B. = ohne pathologischen Befund, weiße Box) (n=9) bzw. mit Thoraxverletzung (graue Box, n=68). Konzentration von sRAGE und IL-6 in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. *: $p < 0,05$.

RAGE zeigt eine konstitutiv hohe Expression in diversen Zelltypen der Lunge (alveoläre Typ I und II-Zellen, pulmonales Endothel) (90). Eine naheliegende Fragestellung ist daher, ob sRAGE als Marker für eine bestehende Lungenverletzung dienen kann. Patienten wurden anhand ihres Thoraxbefundes bei Aufnahme in die Gruppen „o.p.B.“ (ohne pathologischen Befund) und „Thoraxverletzung“ eingeteilt und die Plasmaspiegel von sRAGE, esRAGE und IL-6 verglichen. Dabei wurde das Vorhandensein einer Thoraxverletzung als Gruppenmerkmal verwendet, da eine solche oftmals mit einer (sekundären) Schädigung der Lunge einhergeht. Als Beispiel sei hier die Rippenserienfraktur genannt, auf deren Basis regelhaft ein (Spannungs-) Pneumothorax oder zumindest eine Lungenkontusion vorliegt.

In der untersuchten Kohorte gab es lediglich 9 Patienten ohne Thoraxverletzung, daher ist die Aussagekraft der vergleichenden Analysen eingeschränkt. Dennoch zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Plasmakonzentration von sRAGE zwischen Patienten mit und ohne Thoraxverletzung (Abb. 20, linke Grafik). Erwartungsgemäß ist dies für das alternative Spleißprodukt esRAGE und den globalen Entzündungsmarker IL-6 nicht der Fall (Abb. 20, mittlere und rechte Grafik).

4.1.7. Die RAGE-Isoformen als Marker für ALI und ARDS

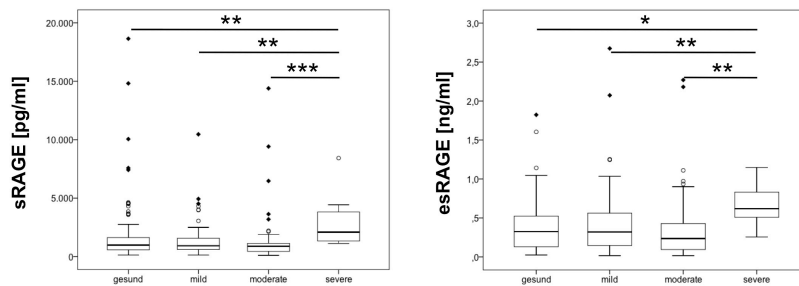


Abbildung 21: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Lungenschädigung. Einteilung erfolgte über alle Zeitpunkte anhand des Horovitzquotienten in die Gruppen „gesund“ (n=134), „mild“ (n=104), „moderate“ (n=64) und „severe“ ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*; n=8). Konzentration von sRAGE in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Neben der anfänglichen traumatischen Schädigung der Lunge kann es im Verlauf des Klinikaufenthaltes, insbesondere bei einer prolongierten Beatmung des Patienten, zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Lungenfunktion kommen. Der Grad der Beeinträchtigung wird anhand des Horovitz-Quotienten quantifiziert, der sich aus dem Verhältnis zwischen arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) und dem Sauerstoffpartialdruck der eingeatmeten Luft (FiO_2) errechnet. *Per definitionem* spricht man ab einem Quotienten von 300 und niedriger von einem milden *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), während ein Wert ≤ 200 einem moderaten und ein Wert ≤ 100 einem schweren ARDS entspricht (91). Auf Basis der Erkenntnis, dass eine initiale Thoraxschädigung zu höheren Plasmakonzentrationen von sRAGE führen kann die Pathophysiologie des ARDS bekanntermaßen einhergeht mit einer schweren Schädigung des alveolären Epithels (92), wurden die Parameter sRAGE und esRAGE bezüglich ihrer diagnostischen Wertigkeit für das Vorliegen nicht-traumatischer Lungenschädigungen untersucht. Dazu wurden über alle Zeitpunkte die Patienten anhand des Horovitz-Quotienten gruppiert und die Mittelwerte von sRAGE (Abb.21 links) und esRAGE (Abb. 21 rechts) zwischen den Gruppen verglichen. Interessanterweise zeigen nur die Patienten mit der schwersten Form eines ARDS signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von sRAGE und esRAGE, während die Werte von Patienten mit mildem oder moderatem ARDS vergleichbar zu Patienten ohne Lungenschädigung sind.

4.2. **RiSaP – eine prospektive Beobachtungsstudie zur Untersuchung von RAGE nach Polytrauma**

4.2.1. **Beschreibung des Untersuchungskollektivs**

Insgesamt 20 Patienten mit Polytrauma wurden für die RiSaP-Studie rekrutiert. Davon wurden die Proben von zwei Patienten als Testproben für die Protokolletablierung verwendet und aufgrund von Abweichungen der Messmethodik zum finalen Protokoll nicht in der Auswertung berücksichtigt. Im Falle von zwei weiteren Patienten wurden diese sekundär nach Erstversorgung in andere Kliniken verlegt, so dass nur jeweils eine Blutentnahme durchführbar war. Aufgrund des Hauptaugenmerks der Studie auf den zeitlichen Verlauf wurden auch diese Patienten ausgeschlossen. Von beiden Kontrollgruppen (gesunde Probanden und Patienten nach abdominal-chirurgischer Operation) wurden sämtliche der jeweils 10 Proben in der Auswertung berücksichtigt.

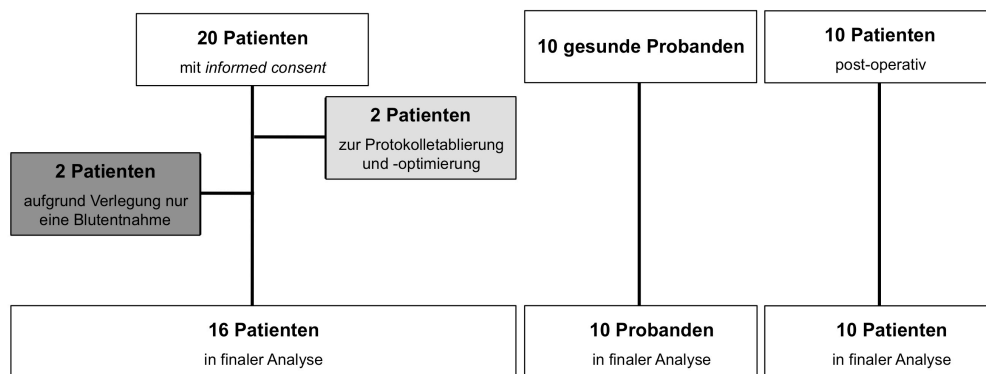


Abbildung 22: Zusammenfassende Darstellung des Studienkollektivs mit Berücksichtigung von Ausschlüssen nach der Rekrutierung.

Erwartungsgemäß überwiegen die männlichen Patienten in der Gruppe der Traumapatienten (87,5 %, Tab.2) bei einem vergleichsweise jungen Durchschnittsalter von 44,1 Jahren. Insbesondere die Gruppe der post-operativen Patienten zeichnet sich durch ein deutlich höheres Durchschnittsalter von 63 Jahren aus, welches aus der konsekutiven Rekrutierung der Patienten ohne Altersstratifizierung resultiert. Die Altersverteilung der gesunden Probandengruppe wurde durch Einschluss von Probanden im Altersbereich der Traumapatienten adaptiert.

Als Hauptursache der Polytraumatisierung sind auch in diesem Kollektiv die Verkehrsunfälle führend (gesamt: 68,75 %). Nahezu alle Patienten imponieren mit Thorax-(87,5 %) und Abdominaltrauma (75 %), während Kopfverletzungen nur in ungefähr einem Drittel der Patienten auftreten (31,25 %). Die eingeschlossenen Patienten der post-operativen Kontrollgruppe unterzogen sich aufgrund maligner Neoplasien großen Operationen zur Entfernung von Teilen des Magen-Darm-Traktes

inklusive Pankreaskopf oder einer Entfernung der Speiseröhre im Falle von zwei Patienten.

Tabelle 2: Demographische Basisdaten der drei Gruppen des RiSaP-Kollektivs. Angaben entsprechen Anzahl (% von gesamt) im Falle von „Geschlecht“, „28-Tage-Sterblichkeit“, „Ursache der Verletzung“ und „OP“ sowie Mittelwert (Min-Max) für „Alter“ und „ISS“.

	Polytrauma	post-OP	gesund
Anzahl der Patienten	16 (100)	10 (100)	10 (100)
Geschlecht			
männlich	14 (87,5)	8 (80)	6 (60)
Alter (Jahren)	44,1 (19-69)	63 (48-76)	38 (28-55)
28-Tage-Sterblichkeit	2 (11)		
ISS	34,1 (19-51)		
Ursache der Verletzung			
Autounfall	7 (43,75)		
Motorradunfall	3 (18,75)		
Unfall als Fussgänger	1 (6,25)		
Sturz	2 (12,5)		
Unbekannt o. andere Ursache	3 (18,75)		
Verletzungen			
Extremitätenfraktur	9 (56,25)		
Fraktur des Achsenskellets	10 (62,5)		
Abdominaltrauma	12 (75)		
Thoraxtrauma	14 (87,5)		
Kopfverletzung	5 (31,25)		
OP			
Ösophagusresektion		2 (20)	
Pankreaskopfresektion		2 (20)	
Gastrektomie		3 (30)	
Hemihepatektomie		1 (10)	
Duodenumresektion		1 (10)	
Hemikolektomie		1 (10)	

4.2.2. Verlauf klinischer Routineparameter nach Polytrauma

Als Routineparameter zur Abschätzung einer Entzündungsreaktion im klinischen Alltag zählt die Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP), einem Akute-Phase-Protein, welches unter anderem bei systemischen Entzündungsprozessen in der Leber sezerniert wird, sowie die Anzahl der Leukozyten im Blut. Ein weiterer bedeutender Parameter von Intensivpatienten ist der Blutzuckerspiegel, der in Situationen von systemischem Stress oftmals erhöht ist und für den in zahlreichen Studien eine Korrelation mit einem negativen Therapieverlauf gezeigt werden konnte (93). Aufgrund der Fragestellung der Arbeit und vor dem Hintergrund, dass hoher oxidativer Stress, wie er bei systemischen Entzündungsreaktionen oder Diabetes mellitus besteht, in Kombination mit erhöhten Blutzuckerspiegeln zu einer vermehrten Bildung von AGEs

führt (94), wurden die vorgenannten Parameter für die untersuchten Traumapatienten deskriptiv ausgewertet.

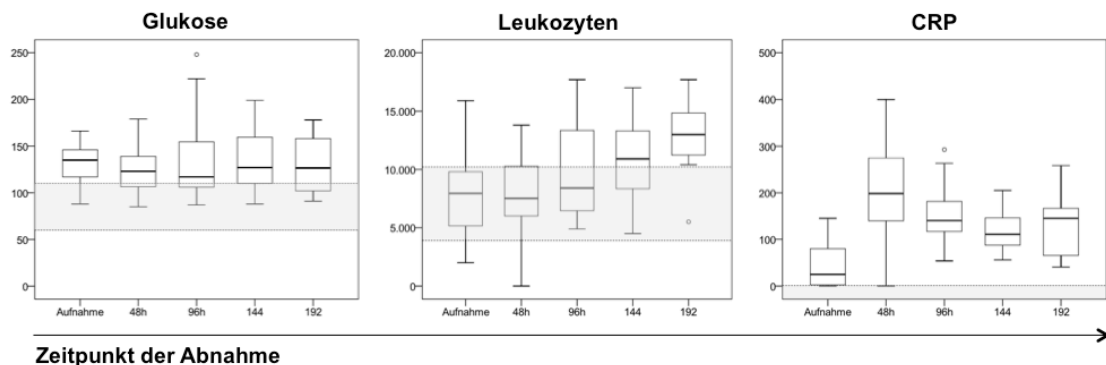


Abbildung 23: Verläufe des Glukosespiegels, der Leukozytenzahl und des C-reaktiven Proteins in Patienten nach Polytrauma. Angabe der Glukose in mg/dl (Referenzbereich: 60-100 mg/dl), Leukozyten in Zellen/µl (Referenzbereich: 3.900 – 10.200 Zellen/µl) und CRP in mg/l (Referenzbereich: 0 – 1 mg/l). Referenzbereiche sind in grauer Schattierung dargestellt. Stichprobengröße: n=16 („Aufnahme“), n=16 („48h“), n=15/15/14 („96h“, n=11 („144h“) und n=10/11/11 („192h“). Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt.

Die Gruppe der Traumapatienten zeigt über den gesamten Beobachtungszeitraum Glukose-Werte oberhalb des Referenzbereichs (Abb. 23, linke Grafik), die jedoch nach den örtlichen Behandlungsalgorithmen der Intensivstation überwiegend als nicht-interventionsbedürftig angesehen wurden. Der Verlauf der Leukozytenzahl zeigt einen Anstieg oberhalb des Referenzbereichs 144 h und 192 h nach Trauma, während die Induktion der CRP-Bildung schon 48 h nach Trauma in einem drastischen Anstieg des Plasmaspiegels gipfelt, der im weiteren Verlauf dann wieder abfällt.

4.2.3. Kinetik der RAGE-Isoformen und IL-6 nach Trauma

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem retrospektiven Traumakollektiv, in welchem ein initialer und transients Anstieg der Plasmakonzentrationen sowohl der RAGE-Isoformen als auch im Trend von IL-6 gezeigt werden konnte, wurden diese Parameter insbesondere auch mit den Werten von gesunden Probanden und Patienten nach OP verglichen.

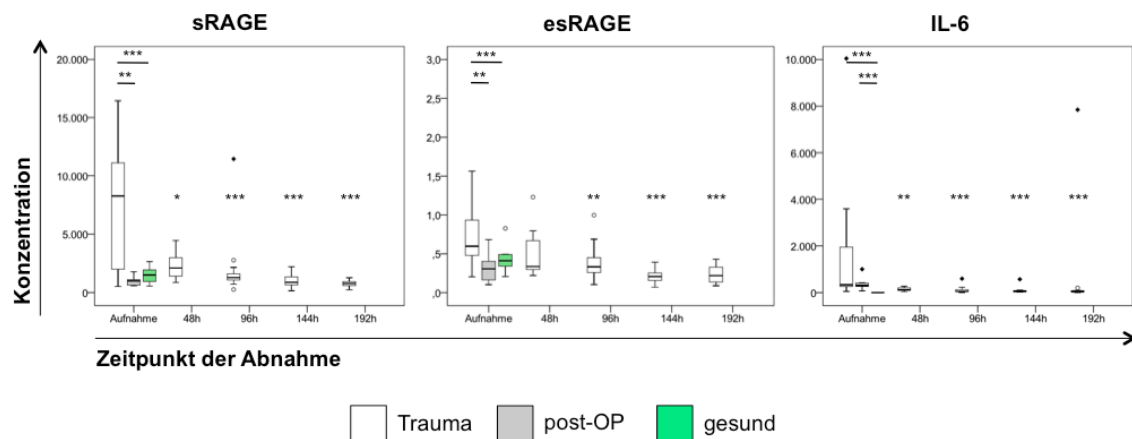


Abbildung 24: Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im Verlauf nach Trauma und initial im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Konzentration von sRAGE und IL-6 in pg/ml, esRAGE in ng/ml. Stichprobengröße: n=16/10/10 („Aufnahme“; Trauma/ post-OP/ gesund), n=16 („48h“), n=15 („96h“), n=11 („144h“) und n=11 („192h“). Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf den Wert bei Aufnahme bzw. auf Kontrollgruppen (initial). **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Das prospektive Kollektiv bestätigt umfänglich die Ergebnisse der retrospektiven Studie, auch hier kommt es bei den Patienten nach Trauma zu einem schnellen, transienten Anstieg von sRAGE (Abb. 24, linke Grafik) und esRAGE (rechte Grafik). Hervorzuheben ist hier, dass Traumapatienten bei Aufnahme signifikant höhere Plasmakonzentrationen zeigen als gesunde Probanden und Patienten unmittelbar nach Operation. Die ansonsten vergleichbare immunologische Reaktion in der Anfangsphase scheint sich im Falle der Entstehung der RAGE-Isoformen zwischen Operation und Traumatisierung zu unterscheiden.

Deutlich wird auch in diesem Kollektiv die rasche Induktion des SIRS anhand der hohen Plasmakonzentration an IL-6. Im Vergleich dazu liegen die IL-6-Plasmaspiegel aller in dieser Studie eingeschlossenen gesunden Probanden unterhalb der Nachweisgrenze des Assay (3,12 pg/ml). Auch Patienten nach Operation zeigen erwartungsgemäß erhöhte IL-6-Konzentrationen, die sich nicht signifikant von der Gruppe der Traumapatienten unterscheiden. Im Verlauf nach Trauma sinken die Konzentrationen schnell auf ein niedrigeres Niveau ab, bleiben aber über den gesamten Beobachtungszeitraum oberhalb der Nachweisgrenze. Nach dem initialen SIRS scheint somit eine prolongierte Phase der subakuten Inflammation zu folgen. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der retrospektiven Kohorte überein, wenngleich die dort gemessenen Plasmaspiegel in der Tendenz höhere Werte zeigen.

4.2.4. Expression von RAGE auf Monozyten im Verlauf nach Polytrauma

Die Immunzellen der myeloiden Reihe, allen voran die Monozyten, stellen die erste Abwehrlinie des Organismus gegen eindringende Pathogene dar und agieren sowohl als Sensoren als auch Effektoren der Immunabwehr. Zur Erkennung des „Feindes“ sind die Monozyten mit einer Vielzahl verschiedener *Pattern Recognition Receptors* bestückt, darunter RAGE.

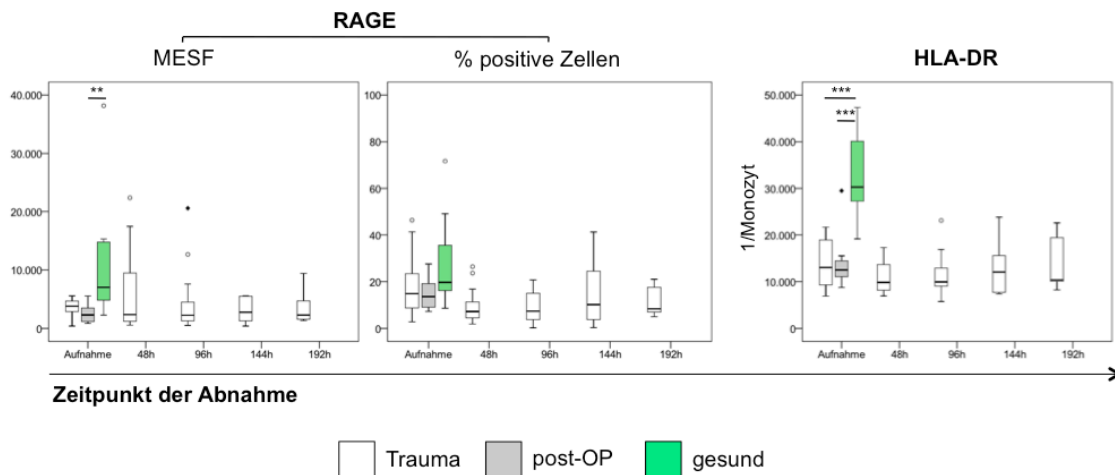


Abbildung 25: Monozytäre Expression von RAGE und HLA-DR im Verlauf nach Trauma und initial im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Expression von RAGE wurde als Antigendichte (MESF: *Multiple Equivalents of Soluble Fluorophore*) und prozentualer Anteil der Zellen erfasst. Werte für HLA-DR entsprechen Anzahl von Molekülen pro Monozyt. Stichprobengröße: n=16/10/10 („Aufnahme“; Trauma/ post-OP/ gesund), n=16 („48h“), n=14 („96h“), n=10 („144h“) und n=8 („192h“). Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf den Wert bei Aufnahme bzw. auf Kontrollgruppen (initial). **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Antigendichte und der Anteil $RAGE^+ CD14^+$ Monozyten wurden in den Patienten nach Trauma mittels Durchflusszytometrie analysiert. Initial zeigt sich bei den Traumapatienten eine im Trend ($p=0,068$) verringerte Antigendichte im Vergleich zu gesunden Probanden. Dieses zeigt sich auch in Patienten nach Operation, hier ist die Antigendichte signifikant geringer als die gesunder Patienten. Im Verlauf zeigt sich bei der Gruppe der Traumapatienten eine persistierende Verringerung über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abbildung 25, linke und mittlere Grafik).

Für den Anteil der $RAGE^+$ -Monozyten ergibt sich initial und im Verlauf kein Unterschied zu den Kontrollgruppen bzw. zum Anteil positiver Zellen bei Aufnahme.

Als valider Surrogatmarker für die globale Funktion der Monozyten hat sich die quantitative Messung des HLA-DR-Antigens auf der Zelloberfläche bewährt (95). Im Untersuchungskollektiv ist sowohl bei Traumapatienten als auch bei Patienten nach Operation die HLA-DR-Dichte auf der Oberfläche der Monozyten im Vergleich zu

gesunden Patienten drastisch reduziert. Die HLA-DR-Dichte bleibt bei den Traumapatienten über den gesamten Beobachtungszeitraum auf diesem Niveau, was auf einen verlängerten Zustand eingeschränkter Immunfunktion hindeutet.

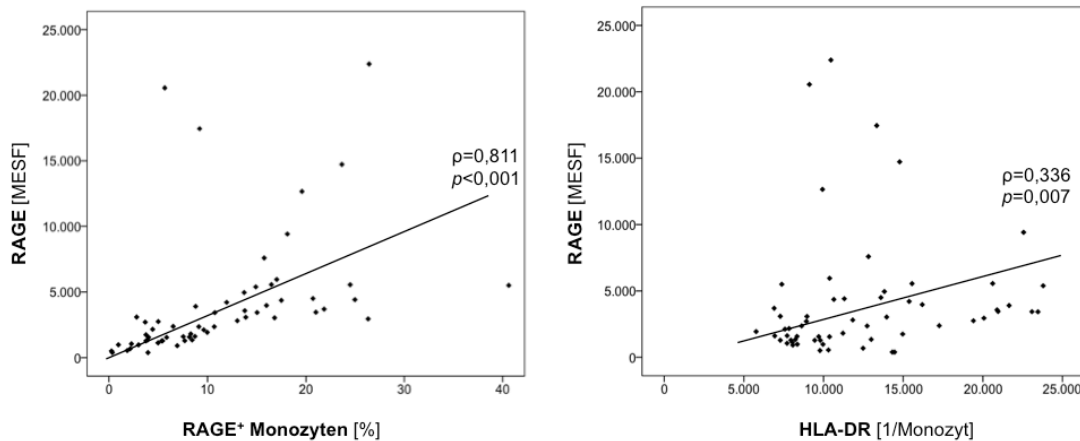


Abbildung 26: Korrelation der Antigendichte von RAGE mit dem Anteil RAGE⁺-Monozyten und der Anzahl von HLA-DR-Molekülen bei Traumapatienten über alle Zeitpunkte. Korrelation nach Spearman-Rho, n=64.

Bei Traumapatienten korreliert die Antigendichte von RAGE auf CD14⁺-Monozyten stark mit der Anzahl RAGE⁺-Monozyten (Abb. 26, linke Grafik) sowie mäßig, wenngleich signifikant mit der Menge an monozytären HLA-DR-Molekülen (Abb. 25, rechte Grafik). Patienten mit einem höheren Anteil an RAGE⁺-Monozyten zeichnen sich somit auch durch mehr RAGE-Moleküle auf der Zelloberfläche aus, was zum einen in der technischen Durchführung der Messung und zum anderen in einer Synergie zwischen einer Expansion der Population und der Expressionssteigerung von RAGE begründet liegen kann. Interessant ist, dass eine Verringerung der HLA-DR-Expression und damit einer Verringerung der Immunkompetenz sich teilweise auch in einem Absinken der RAGE-Antigendichte manifestiert. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Effektorfunktion der Monozyten (Antigenpräsentation über den MHCII-Komplex (HLA-DR)), sondern auch die rezeptorvermittelte Erkennungsfähigkeit von DAMPs und PAMPs gestört ist.

4.2.5. Kinetik der RAGE-Liganden im Verlauf nach Polytrauma

Bei RAGE handelt es sich um einen Multiligandenrezeptor, dessen Liganden überwiegend körpereigene Moleküle wie DAMPs oder inflammatorische Botenstoffe darstellen. Wie viele andere PRRs teilt sich jedoch auch RAGE seine Liganden mit anderen Rezeptoren, darunter dem TLR4. Grob unterteilen lassen sich die zahlreichen Liganden in die Gruppe der Faktoren, die in ihrer biologisch wirksamen Form sezerniert bzw. freigesetzt werden (HMGB1, S100A8, S100A12) sowie die Liganden,

die durch Modifikation von Plasmaproteinen (z.B. Albumin) entstehen. Die Messung der verschiedenen Liganden zur Abschätzung der Ligandenlast von RAGE im Rahmen der posttraumatischen Immunreaktion war Ziel dieses Projekts.

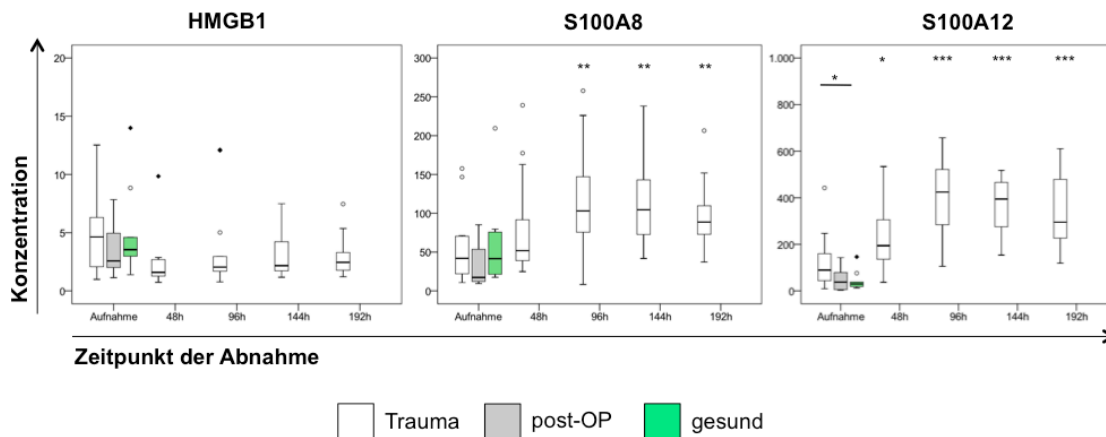


Abbildung 27: Plasmakonzentrationen von HMGB1, S100A8 und A12 im zeitlichen Verlauf nach Trauma. Konzentrationsangaben in ng/ml. Stichprobengröße: n=16/10/10 („Aufnahme“; Trauma/ post-OP/ gesund), n=16 („48h“), n=15 („96h“), n=10 („144h“) und n=10 („192h“). Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf den Wert bei Aufnahme bzw. auf Kontrollgruppen (initial). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$.

Die Plasmakonzentrationen des prototypischen DAMPs HMGB1, welches sowohl aktiv von Immunzellen sezerniert als auch von nahezu allen Körperzellen während der Nekrose freigesetzt wird, zeigen weder initial zwischen den Gruppen noch im zeitlichen Verlauf nach Trauma klare Veränderungen (Abb. 27, linke Grafik). Dahingegen zeigen sowohl S100A8 als auch S100A12 nach Trauma eine verzögerte Kinetik, erst 96h nach Trauma erreichen die Plasmakonzentrationen das Maximum (Abb. 27 mittlere und rechte Grafik). Während S100A8 im Vergleich zu den Kontrollgruppen keinen Unterschied zeigt, ist die Konzentration von S100A12 im Plasma schon initial nach Trauma signifikant höher als die Werte gesunder Probanden. Die verzögerte Kinetik der Calgranuline S100A8 und A12 steht somit der schnellen Induktion der proinflammatorischen Reaktion gegenüber, die sich unter anderem durch die hohen Konzentrationen an IL-6 in der frühen Phase nach Trauma manifestiert.

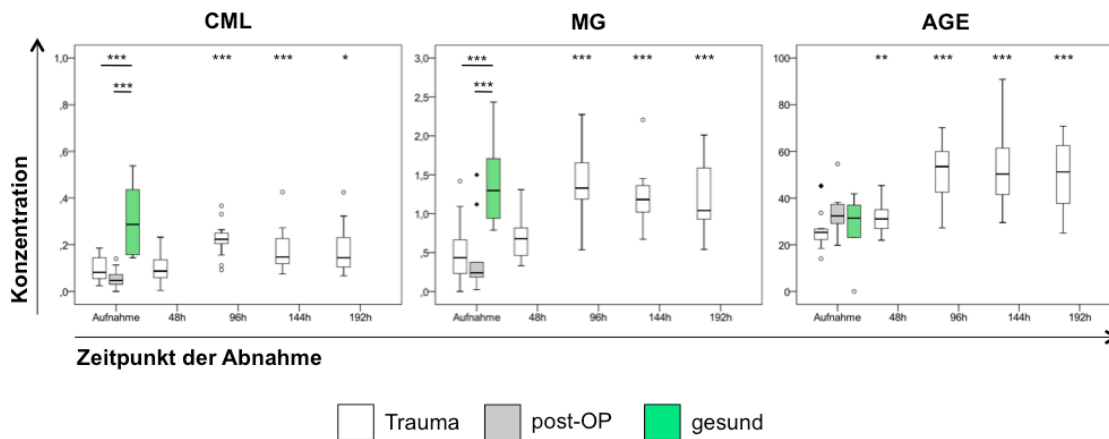


Abbildung 28: Plasmakonzentrationen von CML-, MG- und AGE-modifizierten Proteinen im zeitlichen Verlauf nach Trauma. Konzentrationsangaben in ng/ml (für CML und MG) oder µg/ml (AGE). CML: N(ε)-Carboxymethyllysine, MG: Methylglyoxal, AGE: *Advanced Glycation Endproducts*. Stichprobengröße: n=16/10/10 („Aufnahme“; Trauma/ post-OP/ gesund), n=16 („48h“), n=14 („96h“), n=10 („144h“) und n=8 („192h“). Obere und untere Ränder der Box repräsentieren das 25. bzw. 75. Perzentil, die horizontale Linie entspricht dem Median. Whisker erstrecken sich über die 1,5fache Boxhöhe bzw. den Maximalwert. Ausreißer sind als Kreise und Rauten dargestellt. Signifikanzwerte beziehen sich jeweils auf den Wert bei Aufnahme bzw. auf Kontrollgruppen (initial). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Für die Gruppe der modifizierten Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit die Konzentrationen von N(ε)-Carboxymethyllysine- (CML-) und Methylglyoxal- (MG-) modifizierten Plasmaproteinen sowie die Gesamtkonzentration von AGE-modifizierten Proteinen mittels ELISA gemessen. Paradoxe Weise sinken die Plasmaspiegel von CML- und MG-Proteinen sowohl bei Traumapatienten als auch bei operativen Patienten signifikant unter den Wert gesunder Probanden (Abb. 28, linke und mittlere Grafik). Im zeitlichen Verlauf steigen die Werte im Falle der Traumapatienten dann wieder bei beiden Analyten auf das Niveau gesunder Probanden an. Im Gegensatz dazu zeigt sich initial kein Unterschied in der Gesamtkonzentration der AGEs zwischen Trauma und den Kontrollgruppen, wohingegen es im zeitlichen Verlauf zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg kommt, dessen Kinetik dem der Calgranuline S100A8 und A12 ähnelt (Abb.27, mittlere und rechte Grafik). Wie im retrospektiven Kollektiv gezeigt, korrelieren die Konzentrationen von sRAGE auch in diesem Fall signifikant mit esRAGE ($p=0,791$, Tabelle 3 Anhang) und es besteht zudem eine negative Korrelation zwischen den löslichen Formen von RAGE und den meisten der untersuchten Liganden. Letzteres deutet darauf hin, dass die löslichen Isoformen von RAGE als Decoyrezeptoren fungieren, die Liganden abfangen können. Um das Zusammenspiel der analysierten Parameter weitergehend zu entschlüsseln, wurde das statistische Verfahren der Hauptkomponentenanalyse angewendet. Das Verfahren beruht darauf, dass Variablen mit gleichem Informationsgehalt zusammengefasst werden in sogenannte „Faktoren“ und dadurch eine Dimensionsreduktion der Daten stattfindet. Im Fall der vorliegenden Daten der Traumapatienten über alle Zeitpunkte

ergab die Analyse, dass drei Faktoren (Eigenwert >1; Abb. 29 A) den gleichen Informationsgehalt besitzen wie die ursprünglich 10 inkludierten Variablen. Eine Gruppierung der jeweils höchsten Scores jeder Komponente anhand der rotierten Komponentenmatrix (Abb. 29 B) zeigt eine klare Auftrennung der Variablen mit hohen Konzentrationen in der Frühphase nach Trauma (Komponente 1) und der späten Phase (Komponenten 2 und 3). Zudem trennen sich die Variablen der späten Phase auf in die Gruppe der modifizierten Proteine sowie der Calgranuline zusammen mit dem CRP.

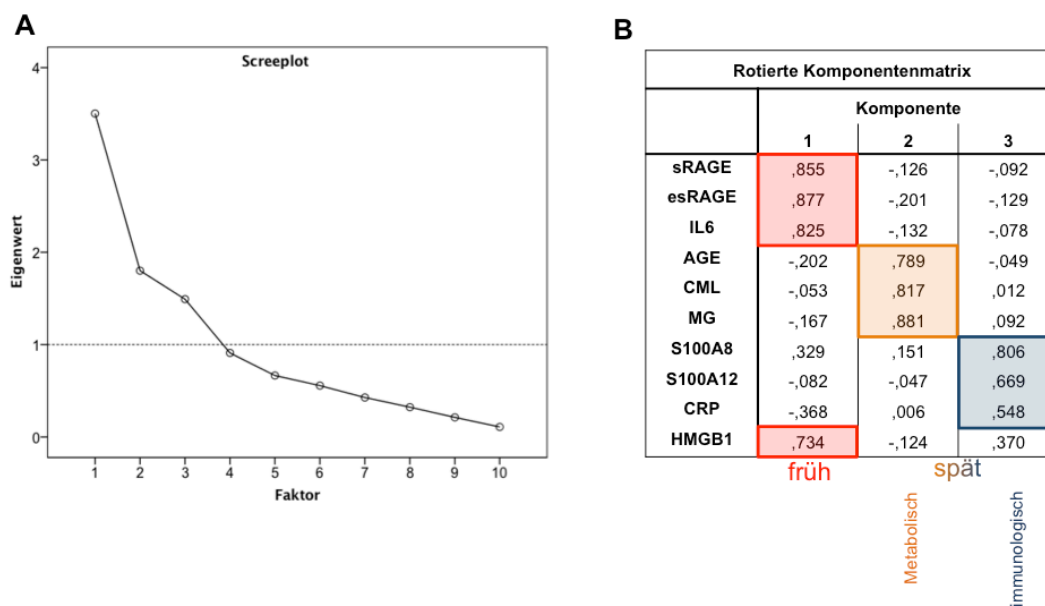


Abbildung 29: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse der plasmatischen Parameter der Traumapatienten über alle Zeitpunkte. (A) Screeplot zur Bestimmung der notwendigen Faktorenzahl unter Beibehaltung des Informationsgehalts, (B) rotierte Komponentenmatrix mit farblicher Zuordnung der Variablen anhand des Scores.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Immunreaktion nach Trauma einen (mindestens) biphasigen Verlauf besitzt, mit einer frühen Phase gekennzeichnet durch die Entstehung „klassischer“ Zytokine wie IL-6 und einer sekundären Phase, die sich durch das Erscheinen von zytokinähnlichen Faktoren wie S100A8 und A12 sowie metabolisch modifizierter Plasmaproteine auszeichnet.

4.3. Konsequenz der Aktivierung der AGE-RAGE-Achse – eine *in vitro* Studie

4.3.1. Charakterisierung der Zelllinie MonoMac-6

Etablierte Zelllinien unterscheiden sich im Vergleich zu ihren primären Pendanten oftmals gravierend in grundlegenden Aspekten wie der Expression bestimmter Gene oder der Reaktionsfähigkeit. Bei der Zelllinie MonoMac-6 handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie humanen Ursprungs mit Merkmalen reifer, primärer Monozyten (96). Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit war die bekannte Eigenschaft der Zellen, auf eine initiale Stimulation mit LPS die Expression von TNF- α zu reduzieren und einen Zustand der Endotoxintoleranz einzunehmen (97). Um die Tauglichkeit der Zelllinie für die geplanten Experimente zu evaluieren, wurde zunächst die Expression verschiedener PRRs (RAGE, TLRs 2, 4 und 5) im Vergleich zu isolierten primären CD14⁺- Monozyten untersucht. Für alle untersuchten PRR konnte eine Expression der entsprechenden mRNA nachgewiesen werden (Abb. 30 A), die Expressionsstärke ist dabei vergleichbar zu primären Monozyten. Für RAGE zeigt sich in der RT-PCR ein doppeltes Produkt, dessen Größen nach Abgleich mit der bioinformatischen Datenbank des *UCSC Genome Browser* mit zwei bekannten Spleißvarianten des *AGER*-Transkripts übereinstimmen.

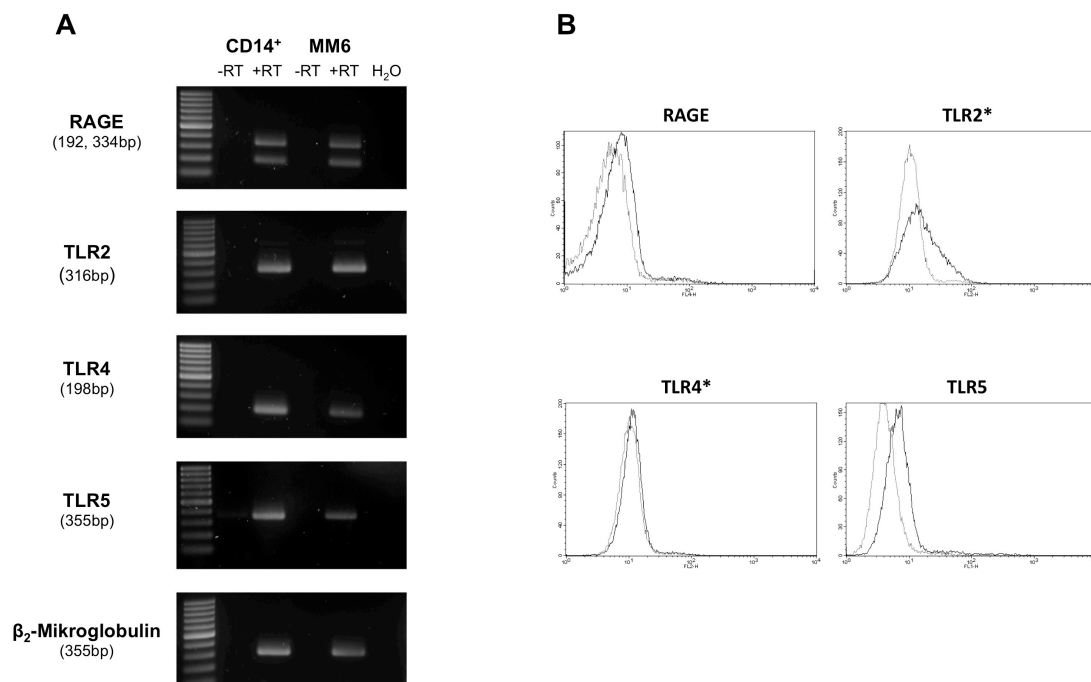


Abbildung 30: Analyse der Expression von RAGE und der TLRs 2,4 und 5 auf RNA und Proteinebene. (A) Ergebnisse der RT-PCR im Vergleich zu CD14⁺ Monozyten, visualisiert in 2%igem Agarosegel nach Färbung mit SybrSafe; -RT: Kontrolle ohne vorangegangene Reverse Transkription, H₂O: Kontrolle ohne Template (B) Durchflusszytometrie, Färbung der Isotypkontrolle als graue Linie dargestellt, Antikörperfärbung mit schwarzer Linie. *: Antikörper gegen TLR2 und 4 mit gleicher Isotypkontrolle, da gleiche Klasse.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der Rezeptoren auf Ebene der Zellmembran untersucht. Während für RAGE, TLR2 und TLR5 eine schwache Expression nachweisbar war, zeigt die Färbung für TLR4 kein stärkeres Signal als die Isotypkontrolle (Abb. 30 B). Aufgrund des positiven Nachweis der Genexpression und der publizierten Daten erscheint dies ein Problem des verwendeten Antikörpers zu sein.

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen in Bezug auf ihre immunologische Reaktionsfähigkeit wurden die Zellen für 24 h mit LPS oder AGE-modifiziertem bovinem Serumalbumin (AGE-BSA) inkubiert. Eine bekannte Reaktion der MonoMac-6-Zellen nach Erkennung von LPS ist die Ausbildung von Zellclustern, was durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen ausgelöst wird. Dieses Phänomen lässt sich auch in unserer Kultur gut zeigen, scheint jedoch spezifisch für LPS zu sein, da eine Inkubation mit AGE-BSA nicht zu einer derartigen Reaktion führt (Abb. 31 A). Eine zentrale Eigenschaft monozytärer Zellen ist die Fähigkeit, auf einen immunologischen Stimulus mit der Expression und Sekretion von Zytokinen zu reagieren. Um diese Eigenschaft zu prüfen, wurden Kulturüberstände stimulierter Zellen mittels Zytokinarray auf die Anwesenheit verschiedener Zytokine untersucht.

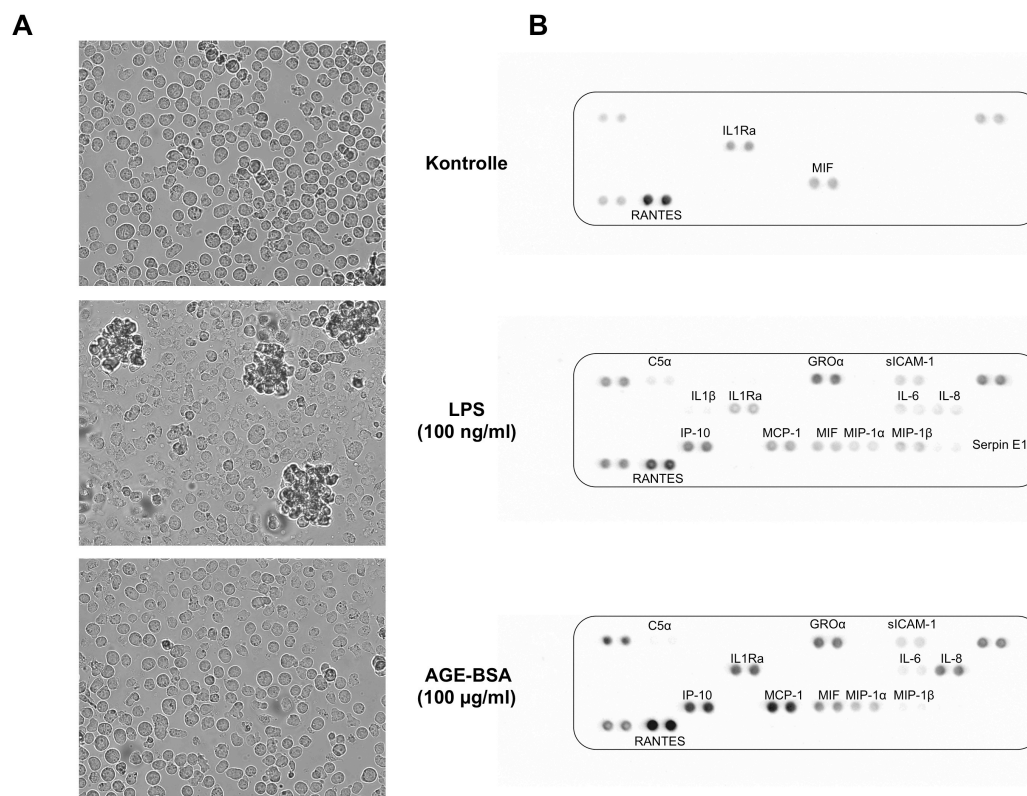


Abbildung 31: Charakterisierung der zellulären Reaktion auf eine Stimulation mit LPS oder AGE-BSA. Stimulation für 24 h mit angegebenen Konzentrationen und Stoffen. (A) Durchlichtmikroskopische Aufnahme der Kultur unter Stimulationsbedingungen (B) Überstände von 3 unabhängigen Experimenten wurden gepoolt und mittels *Cytokine Array* auf die Anwesenheit von Zytokinen untersucht. Beschriftung entspricht dem detektierten Analyt, Signale ohne Beschriftung entsprechen Positivkontrollen.

Ohne Stimulation sezernieren die Zellen nur wenige Zytokine (RANTES, MIF und IL1Ra) (Abb. 31 B „Kontrolle“), nach Stimulation mit LPS oder AGE-BSA vergrößert sich die Anzahl deutlich. Bis auf wenige Ausnahmen stimmen die Reaktionsmuster zwischen LPS- und AGE-BSA- stimulierten Zellen überein, lediglich die Faktoren IL-1 β und Serpin E1 scheinen in diesem Experiment nur nach Stimulation mit LPS gebildet zu werden.

Überraschenderweise zeigen die Arrays bei keiner Stimulation einen Nachweis von TNF- α . Um dieses Phänomen zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit unterschiedlicher Stimulationszeit durchgeführt und die Konzentration von TNF- α mittels ELISA bestimmt. Damit konnte eine klare Reaktion der Zelllinie sowohl auf eine Stimulation mit LPS als auch AGE-BSA nachgewiesen werden. Die maximalen Konzentrationen im Kulturüberstand sind nach ungefähr 4 h Stimulation nachweisbar, nachfolgend kommt es zu einem Abfall der Konzentrationen. Dies deutet auf ein Überwiegen der Abbauprozesse in Relation zur Neubildung hin. Eine Stimulation mit AGE-BSA zeigt einen ähnlichen Verlauf wie eine Stimulation mit LPS, jedoch ist die Amplitude der TNF- α -Konzentration geringer (Abb. 32).

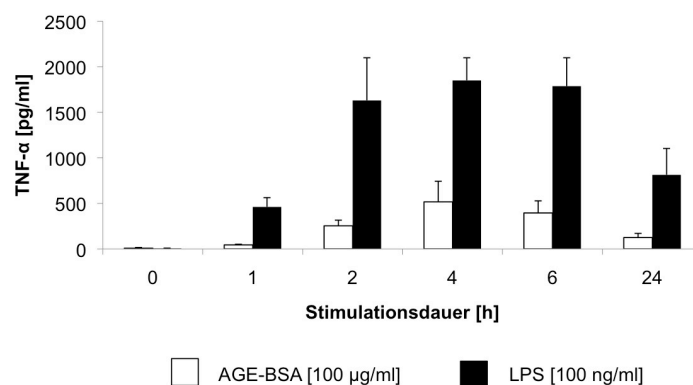


Abbildung 32: Kinetik der TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer mit LPS und AGE-BSA. Stimulation erfolgte mit den angegebenen Konzentrationen. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, n=3.

Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Array und ELISA mögen in der Spezifität der Antikörper begründet liegen. Während der ELISA nach Auskunft der Herstellerfirma auch im Komplex gebundenes TNF- α (zum Beispiel mit löslichen TNF-Rezeptoren) detektieren kann, scheinen die Antikörper des Arrays andere, in diesem experimentellen Kontext möglicherweise maskierte Epitope zu erkennen und erbringen damit einen falsch-negative Nachweis. Zusammenfassend besitzt die Zelllinie MonoMac-6, insbesondere bezogen auf die Reaktionsfähigkeit, alle relevanten

Merkmale, die für die Durchführung von Experimenten zur Charakterisierung der immunologischen Wirkung von AGE-modifizierten Proteinen notwendig sind. Alle weiteren Experimente (mit Ausnahme der Versuche an primären Zellen) wurden daher mit dieser Zelllinie durchgeführt.

4.3.2. Initiales Screening zum Einfluss des Primings mit verschiedenen PRR-Liganden auf die sekundäre Reaktionsfähigkeit

Die Vorversuche zur zeitlichen Kinetik der TNF- α -Konzentration zeigen einen deutlichen Rückgang der Konzentration nach 24 h. Für die zweistufigen Experimente mit initialen Priming wurde daher eine Inkubationsdauer von 24h für jeden Schritt gewählt, um eine ggf. Überlagerung der Reaktion zu minimieren.

LPS ist bekanntermaßen in der Lage, MonoMac-6-Zellen für eine weitere Reaktion zu desensibilisieren. Ob dieses Phänomen der Toleranzinduktion in MonoMac-6-Zellen auf LPS beschränkt ist und ob eine Kreuztoleranz zu anderen immunologisch wirksamen Liganden besteht, sollte in einem Screeningansatz untersucht werden. Dazu erfolgte die Stimulation der Zellen für 24 h mit Liganden von TLR2 (Lipoteichonsäure LTA und Pam3CSK4), TLR4 (LPS), TLR5 (Flagellin), Dectin-1 (Zymosan) und RAGE (HMGB1-Cytokin, HMGB1-Chemokin, AGE-BSA und sRAGE-Fc). Anschließend erfolgte nach Mediumwechsel die erneute Stimulation der Ansätze (jeder mit jedem) und Inkubation für weitere 24 h. Als Parameter wurde danach die TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand bestimmt.

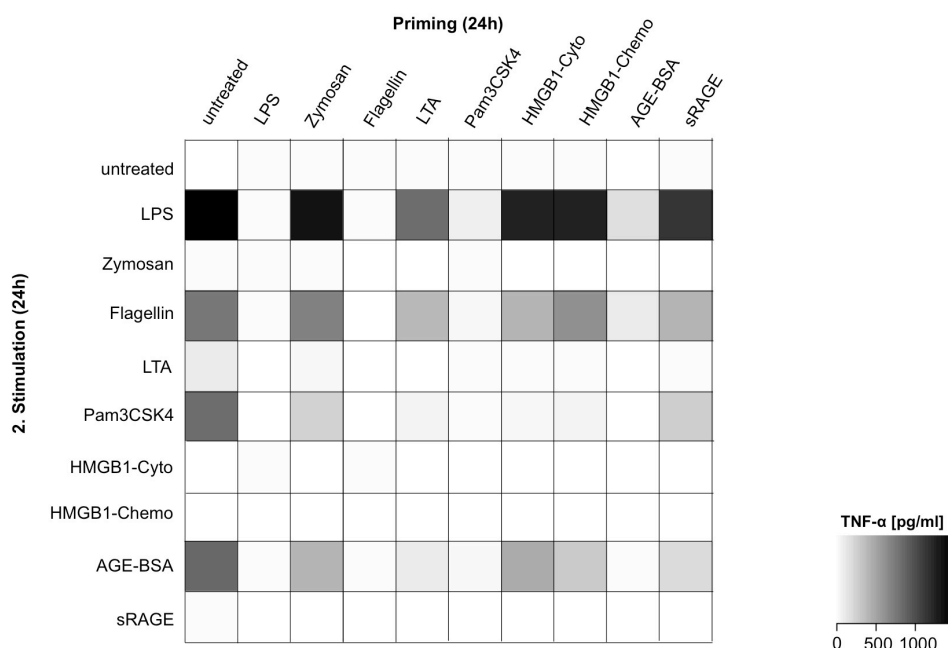


Abbildung 33: TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen mit diversen Liganden. Darstellung als *Heatmap*, Intensität der Feldfarbe entspricht der TNF- α -Konzentration (n=2)

Eine Reaktion der Zellen konnte nur für LPS, Flagellin, LTA, Pam3CSK4 und AGE-BSA nachgewiesen werden (Abb. 33, Spalte „untreated“). Ein Priming der Zellen mit diesen Liganden löste dabei eine mehr oder weniger starke Selbst- und Kreuztoleranz aus, wobei die LPS-induzierte Toleranz am stärksten ausgeprägt war (Abb.33, Spalte „LPS“).

4.3.3. Verifizierung der Ergebnisse des Screenings

Zur Verifikation der im Screen identifizierte Eigenschaft der Liganden, eine Selbst- und Kreuztoleranz zu induzieren wurden die Experimente nach gleichem Versuchsschema mehrfach (n=5) und unter Verwendung der Zellen in verschiedenen Passagen nach Inkulturnahme aus dem Stickstofflager wiederholt.

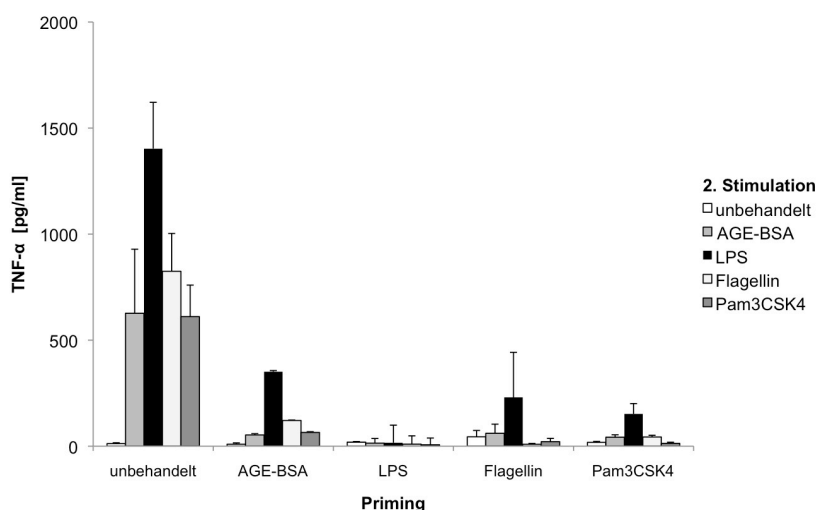


Abbildung 34: TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen mit ausgesuchten Liganden. Angaben auf der X-Achse entsprechen dem für das Priming verwendeten Liganden, die Säulenfarbe der in der Legende angegebenen 2. Stimulation. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM (n=5)

Tabelle 3: Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen. Verglichen wurden die Mittelwerte jeweils gegen die Kontrollgruppe ohne initiales Priming („Kontrolle“) mittels des einfaktoriellen ANOVA-Verfahrens für verbundene Stichproben mit nachfolgendem Dunnett-Test. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$

		Priming				
		unbehandelt	AGE-BSA	LPS	Flagellin	P3C
2. Stimulation	unbehandelt	Kontrolle				
	AGE-BSA	Kontrolle	*	*	*	**
	LPS	Kontrolle	***	***	***	***
	Flagellin	Kontrolle	***	***	***	***
	P3C	Kontrolle	***	***	***	***

4.3.4. Die AGE-induzierte Selbst- und Kreuztoleranz ist dosisabhängig und nicht beschränkt auf die Sekretion von TNF- α

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, welche Konzentrationen von LPS oder AGE-BSA notwendig sind, um eine Toleranz zu induzieren. Dazu wurden die Zellen nach dem bekannten Schema für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert und nach Mediumwechsel mit einer wirksamen Konzentration (LPS: 100 ng/ml, AGE-BSA: 100 μ g/ml) restimuliert. LPS zeichnet sich durch eine hohe Potenz aus, selbst eine 1000fach geringere Konzentration als ursprünglich verwendet führt zu einer drastischen Toleranz (0,1 ng/ml). Indessen werden von AGE-BSA höhere Konzentrationen benötigt und erst die höchste Konzentration (100 μ g/ml) führt zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Konzentration sowohl bei einer Re-Stimulation mit LPS (Abb.35, oben) als auch AGE-BSA (Abb.35, unten).

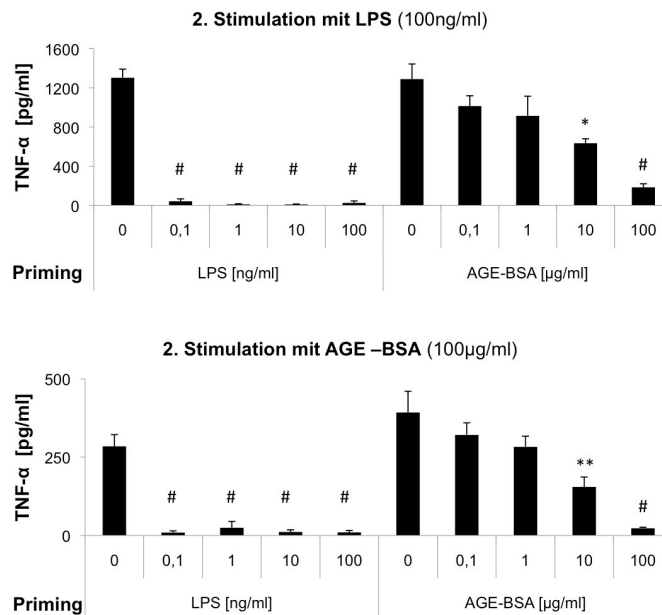


Abbildung 35: TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen in Abhängigkeit von der Primingkonzentration. Zweite Stimulation erfolgte mit 100ng/ml LPS (obere Grafik) oder 100 μ g/ml AGE-BSA (untere Grafik). Die für das Priming verwendeten Konzentrationen sind auf der X-Achse angegeben. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM (n=4). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, #: $p<0,001$

Um zu untersuchen, in wie weit auch andere Zytokine von der Toleranzinduktion betroffen sind, wurden die Konzentrationen von IL-10, IL-6, IL-1 β und TNF- α (als Positivkontrolle) in den Überständen mittels *Cytometric Bead Assays* erneut gemessen. Diese durchflusszytometrische Methode erlaubt zeitgleiche Quantifizierung von mehreren Analyten.

Bei allen gemessenen Zytokinen zeigt sich eine ähnliche Toleranzinduktion wie bei TNF- α , insbesondere auch mit einer vergleichbaren Kinetik, was die für eine Toleranzinduktion notwendigen Konzentrationen an LPS und AGE-BSA betrifft (Abb. 36).

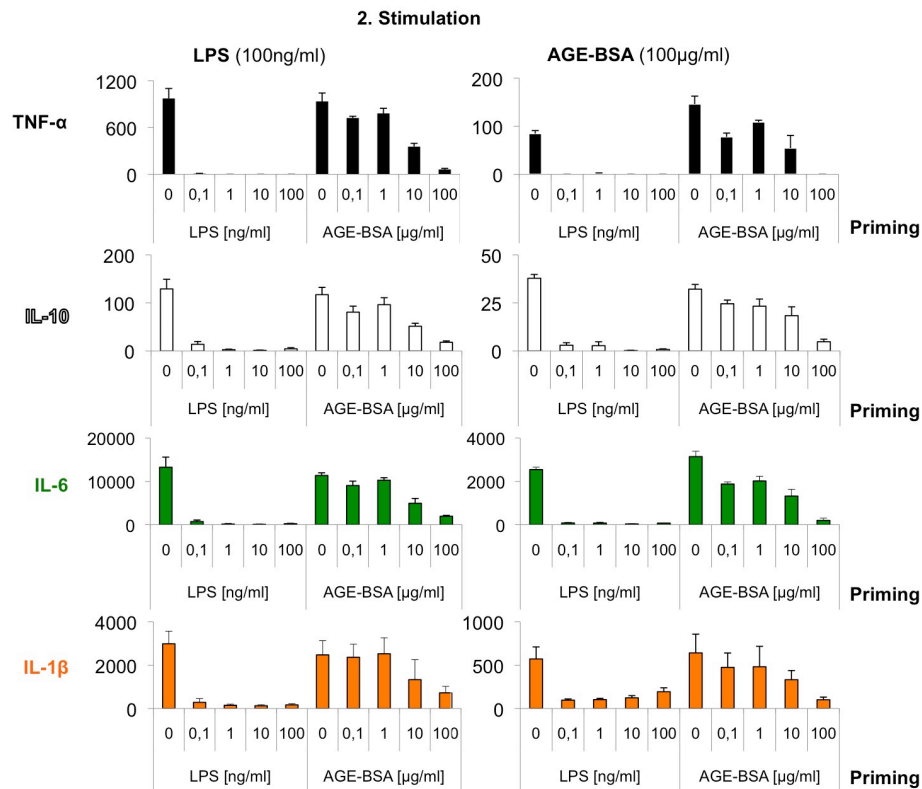


Abbildung 36: Zytokinkonzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen in Abhängigkeit von der für das Priming verwendeten Konzentration. Zweite Stimulation erfolgte mit 100 ng/ml LPS (linke Spalte) oder 100 μ g/ml AGE-BSA (rechte Spalte), für das Priming verwendete Konzentrationen sind auf der X-Achse angegeben. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM in pg/ml, (n=3)

Um auszuschließen, dass das verwendete bovine Albumin auch ohne Modifikation eine unspezifische Proteinwirkung vermittelt und dies zu den beobachteten Effekten führt, wurden Zellen für 24 h mit 100 μ g/ml BSA vorinkubiert und dann nach Mediumwechsel mit LPS oder AGE-BSA restimuliert. BSA ist dabei nicht in der Lage, eine Desensibilisierung der MonoMac-6-Zellen auszulösen, eine erneute Stimulation der Zellen führt zu einer unveränderten Bildung von TNF- α (Abb. 37, Spalte „BSA“). Zusammenfassend wird die Toleranz im Falle des AGE-BSA spezifisch durch die Modifikation des Proteins induziert und zeigt eine starke Konzentrationsabhängigkeit. Sowohl die LPS- als auch die AGE-BSA-Toleranz ist dabei nicht beschränkt auf TNF- α sondern umfasst weitere Zytokine, sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Natur.

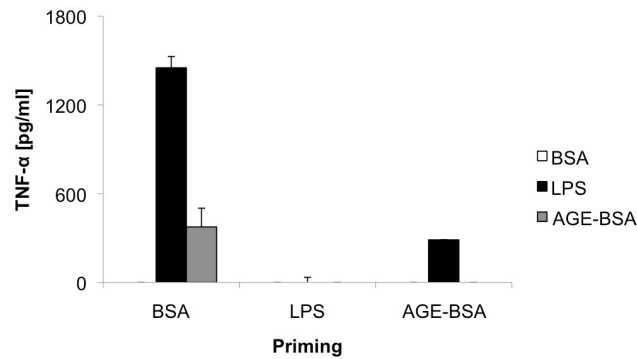


Abbildung 37: TNF- α -Konzentration nach initialem Priming mit unmodifiziertem BSA. Als Positivkontrolle wurden separate Ansätze mit LPS und AGE-BSA mitgeführt. Zweite Stimulation erfolgte mit 100 ng/ml LPS (schwarzer Balken) oder 100 μ g/ml AGE-BSA (grauer Balken). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM (n=3)

4.3.5. Stimulation mit AGE-BSA oder LPS fördert weder Zelltodprozesse noch moduliert sie den Zellzyklus

Viele Stimuli lösen gerade in Zellkultur als Konsequenz ein Absterben der Zellen aus, dabei kann der Zelluntergang je nach Stimulus sowohl apoptotisch als auch nekrotisch ablaufen und das weitere Verhalten der überlebenden Zellen maßgeblich beeinflussen.

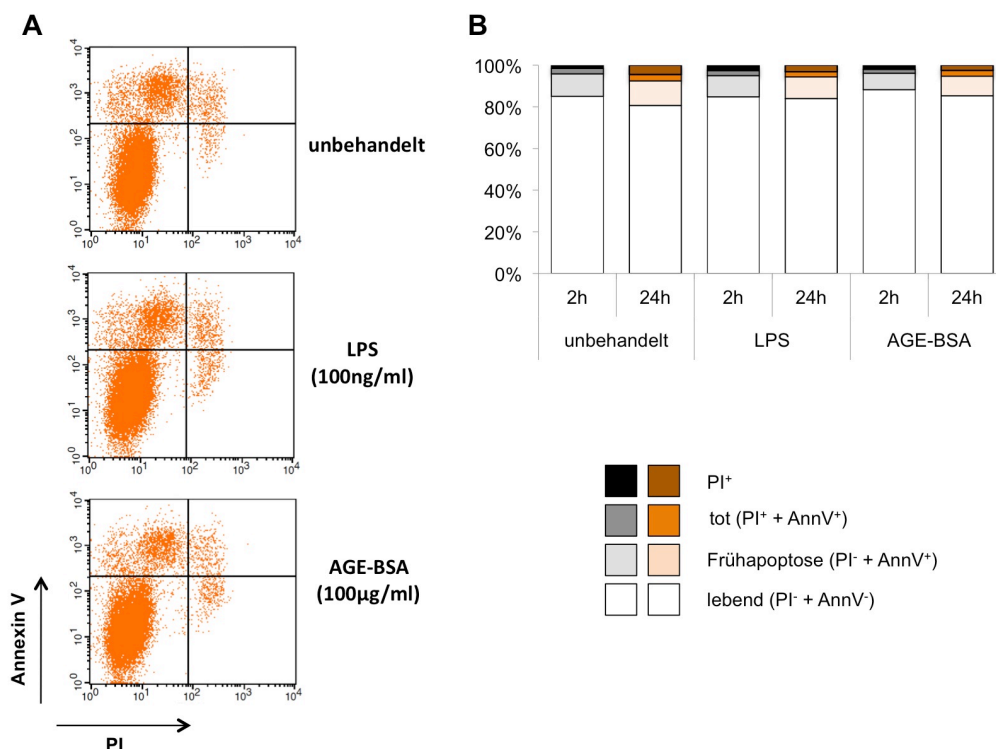


Abbildung 38: Analyse der Apoptose/Nekrose nach Stimulation der Zellen für 2 und. 24h mit LPS oder AGE-BSA. Untersuchung erfolgte mittels kombinierter Annexin V-APC und Propidiumiodid (PI)-Färbung mit anschließender Messung im Durchflusszytometer. (A) Repräsentatives Einzelexperiment nach 24 h Stimulation, (B) Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten nach 2 h (graue Säulen) oder 24 h (orange Säulen) Stimulation.

Um die experimentellen Rahmenbedingungen hinsichtlich eventueller Interferenzen durch Zelltodprozesse zu kontrollieren, erfolgte die Quantifizierung der Apoptose- und Nekroserate in der Zellkultur nach 2 h und 24 h Stimulation. Dabei zeigte sich nach Stimulation weder für LPS noch für AGE-BSA eine Veränderung (Abb.38 B).

Zudem sollte ausgeschlossen werden, dass es durch Störungen des Zellzyklus und einer damit verbundenen verringerten Proliferationsrate zu einer Beeinflussung der extrazellulär messbaren Zytokinkonzentrationen kommt. Dazu wurde die prozentuale Verteilung der Zellen in die Phasen des Zellzyklus indirekt mittels der durchflusszytometrischen Analyse des DNA-Gehalts bestimmt. Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich keine Veränderung in der Zellkultur nach Stimulation (Abb.39 B).

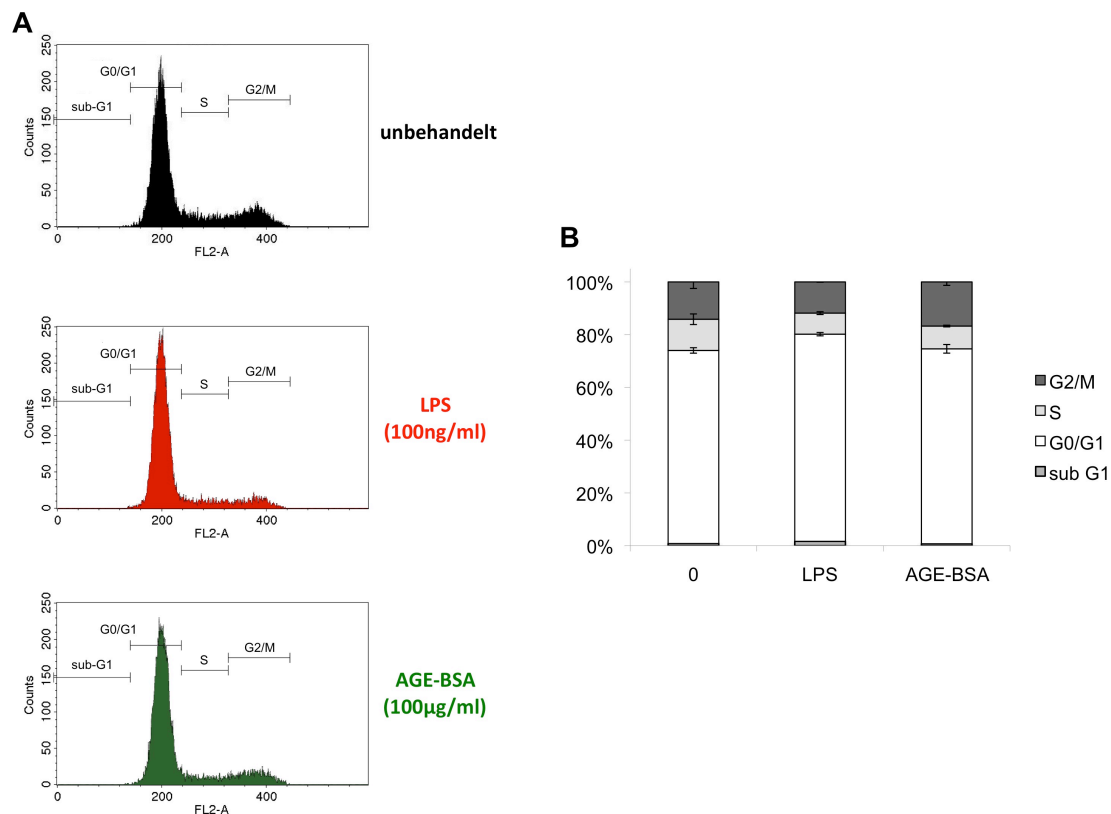


Abbildung 39: Analyse des Zellzyklus nach Stimulation der Zellen für 24h mit LPS oder AGE-BSA. Untersuchung erfolgte nach Fixierung und RNase-Verdau durch intrazelluläre DNA-Färbung mit Propidiumiodid und Messung im Durchflusszytometer. (A) Repräsentative Grafiken eines Einzelexperimentes, (B) Darstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, Fehlerbalken zeigen Standardabweichung.

Zusammenfassend kann somit ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Toleranzinduktion auf einem Absterben der Zellen nach initialer Stimulation oder einer Modulation des Zellzyklus basiert.

4.3.6. Analyse der Genexpression relevanter Faktoren nach Stimulation

Eine Desensibilisierung von Zellen kann auf zahlreichen Ebenen stattfinden. Kommt es zu einem Verlust des Rezeptors, kann die Zelle das Signal nicht mehr erkennen und entsprechend reagieren. Gleiches gilt für die Faktoren, die an der Signaltransduktion *downstream* des Rezeptors beteiligt sind. Schließlich kann auch die Expression von Genen für Effektormoleküle aufgrund (epi-)genomischer Veränderungen verringert sein. Diese drei Ebenen wurden nachfolgend untersucht.

Aufgrund der niedrigen Abundanz der Rezeptoren auf der Zelloberfläche war ein zuverlässiger Nachweis eventueller Änderungen mittels Durchflusszytometrie nicht möglich. Daher erfolgte die quantitative Erfassung der Genexpression mittels PCR. Nach einer Stimulation mit LPS oder AGE-BSA zeigen sich keine Veränderungen in der Expression sowohl von TLR4 als auch von RAGE (Abb. 40 A, TLR4 bzw. AGER). Im Gegensatz dazu reduziert sich die Expression des TLR5 unabhängig vom Stimulus drastisch. Dies deutet auf einen differentiellen Mechanismus der Toleranzinduktion hin.

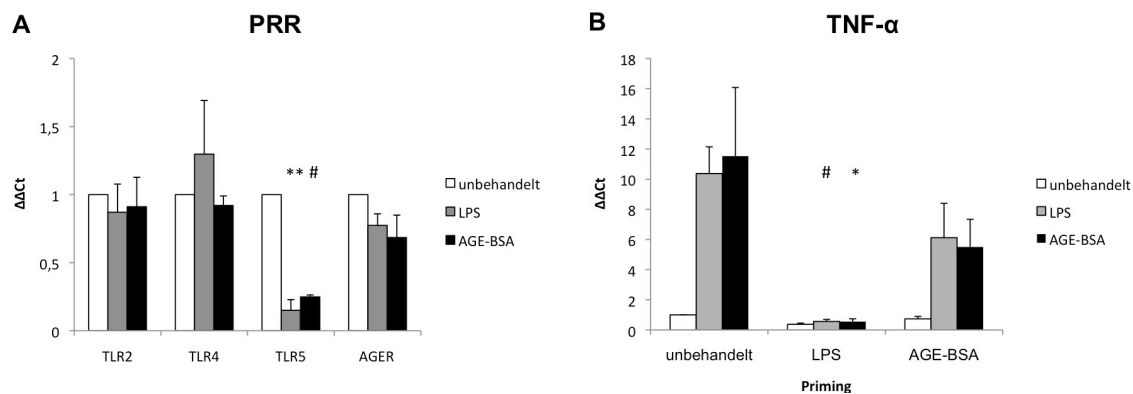


Abbildung 40: Vergleichende Genexpressionsanalyse der Immunrezeptoren und TNF- α vor und nach Stimulation. (A) Expression der TLRs 2, 4, 5 und RAGE nach 24h Stimulation, (B) Analyse der TNF- α -Expression nach Priming und nachfolgender 2. Stimulation für 3h. Ergebnisse dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM ($n=3$ bzw. 4), *: $p<0,05$, #: $p<0,001$ im Vergleich zu unbehandelten (A) bzw. Ansätze ohne Priming (B) (Student's t-Test, 2-seitig, gepaart).

Eine Analyse der Expression des TNF- α -Gens nach Priming und zweiter Stimulation für 3h zeigt, dass während die Expression von TNF- α im Rahmen der LPS-induzierten Toleranz völlig stillgelegt wird, keine signifikante Änderung der Expression nach AGE-BSA-Priming stattfindet (Abb. 40 B). Auch hier deuten sich unterschiedliche Mechanismen an, wobei die drastische LPS-induzierte Stilllegung des TNF- α -Gens schon früher beschrieben wurde (98).

Um die Hypothese zu untersuchen, dass Änderungen in der Genexpression von an der Signaltransduktion beteiligten Faktoren ursächlich sind für die beobachteten Toleranzphänomene wurden insgesamt 84 Gene mittels qPCR-Array untersucht. Die Analyse erfolgte nach 24 h Priming. Es zeigt sich, dass eine Inkubation mit AGE-BSA nur zu wenigen Veränderungen in den untersuchten Genen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führt (Abb.41 A), dabei werden 9 Gene hoch- und nur ein Gen, das Gen für Lymphotoxin α , herunterreguliert (Abb.41 C). Interessanterweise gehören CD14 und *Lymphocyte Antigen 96* (LY96, auch MD2) zu den Genen mit differentieller Hochexpression. Beide sind von hoher Relevanz für die Funktion des TLR4 bei der Erkennung von LPS. Das Genexpressionsmuster nach LPS-Stimulation unterscheidet sich deutlich von dem AGE-BSA-induzierten Muster. Hier werden 22 Gene im Vergleich zur Kontrolle hoch- und 6 Gene herunterreguliert. Zur Gruppe der hochregulierten Gene zählen, neben CD14 und LY96, verschiedene Zytokine und Chemokine sowie pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren (FOS, JUN, NFkB2), aber auch Inhibitoren des zentralen NF- κ B-Signalwegs (NFkB1A = I κ B α). Zu den herunterregulierten Genen gehören zentrale Faktoren der TLR-Signalkaskaden wie *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1) und *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways* (ECSIT). Für IRAK1 konnte bislang in verschiedenen Zusammenhängen eine Beteiligung an der Ausbildung von immunologischer Toleranz gezeigt werden (99,100). Auch das Gen für *Sterile Alpha And TIR Motif Containing 1* (SARM1) zeigt eine verringerte Expression. Dabei handelt es sich um einen negativ-regulatorisch wirkenden Faktor TRIF-abhängiger Signalkaskaden (101).

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der Versuche mit AGE-BSA-stimulierten Zellen keine Anhaltspunkte für eine so nachhaltig veränderte Genexpression der untersuchten Faktoren, dass sich dadurch die beobachtete Toleranz erklären würde. Im Gegensatz dazu deutet die Hochregulation inhibitorischer Faktoren und die reduzierte Expression von zentralen Adapterproteinen in der LPS-Toleranz darauf hin, dass hier zumindest eine Beteiligung vorliegt.

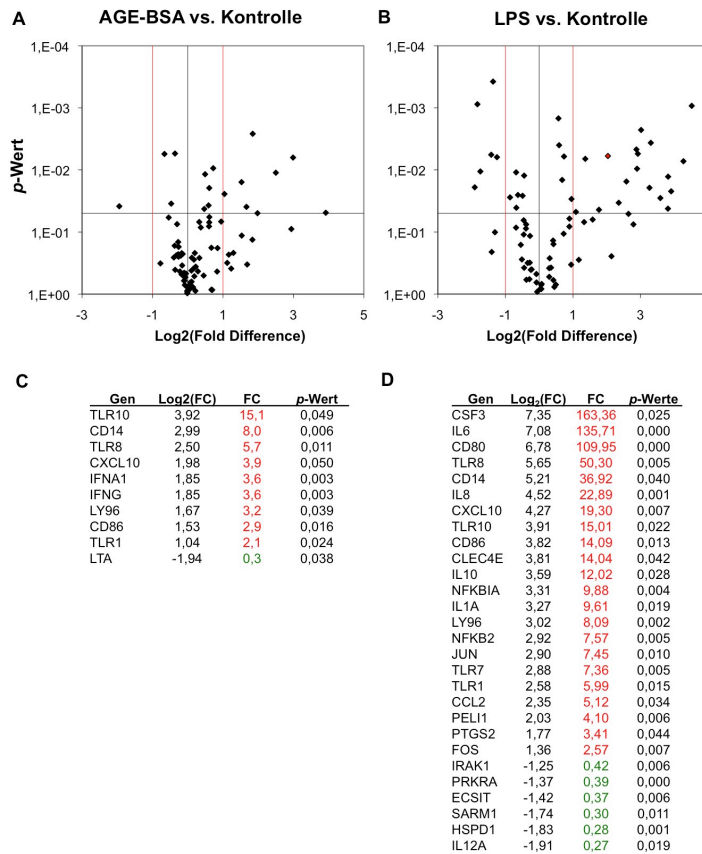


Abbildung 41: Ergebnisse der qPCR-Array-Experimente. Stimulation erfolgte für 24h mit AGE-BSA oder LPS vor RNA-Isolation. (A)+(B) Darstellung der Ergebnisse als Vulkanplot, jeweils AGE-BSA bzw. LPS gegen Kontrolle. Punkte oberhalb der horizontalen Linie repräsentieren signifikant regulierte Gene ($p < 0,05$), Punkte rechts und links der vertikalen roten Linien repräsentieren Gene mit mehr als zweifacher Veränderung zur Kontrolle. (C)+(D) Tabellarische Darstellung der Gene mit einer mehr als zweifachen, signifikanten Veränderung (FC: *fold change*) gegenüber Kontrolle. Gene sind absteigend nach Veränderung sortiert, rote Werte repräsentieren hochregulierte, grüne Werte herunterregulierte Gene. Jeweils $n=3$ pro Gruppe (Kontrolle/AGE-BSA/LPS)

4.3.7. Toleranz ist assoziiert mit einer reduzierten intrazellulären Konzentration an TNF- α nach erneuter Stimulation

Die Regulation der Genexpression auf dem Weg vom unreifen Transkript bis hin zum finalen Protein findet auf verschiedenen Ebenen statt. Die durch AGE-BSA ausgelöste Toleranz scheint dabei nicht in einer Abschaltung der Expression des TNF- α -Gens nach zweiter Stimulation begründet zu liegen. Um zu untersuchen, ob dieses Ergebnis sich auch auf der Proteinebene abzeichnet, wurde diese im Folgenden mittels einer intrazellulären Zytokinfärbung und nachfolgender durchflusszytometrischer Messung untersucht. Dazu erfolgte analog zu den Experimenten zur Analyse der TNF- α -Genexpression die Messung nach Priming und nachfolgender zweiten Stimulation für 3h.

Erwartungsgemäß zeigte sich im Falle der LPS-Toleranz auch auf Ebene des intrazellulären TNF- α -Proteins ein drastisches Absinken auf das Niveau der unbehandelten Zellen, sowohl für eine zweite Stimulation mit LPS als auch mit AGE-BSA. Die AGE-BSA-induzierte Toleranz ist nicht in gleichem Ausmaß stringent, das intrazelluläre Proteinniveau sinkt zwar ebenfalls signifikant ab, verbleibt jedoch deutlich über dem Niveau gänzlich unstimulierter Zellen (Abb.42 A+B).

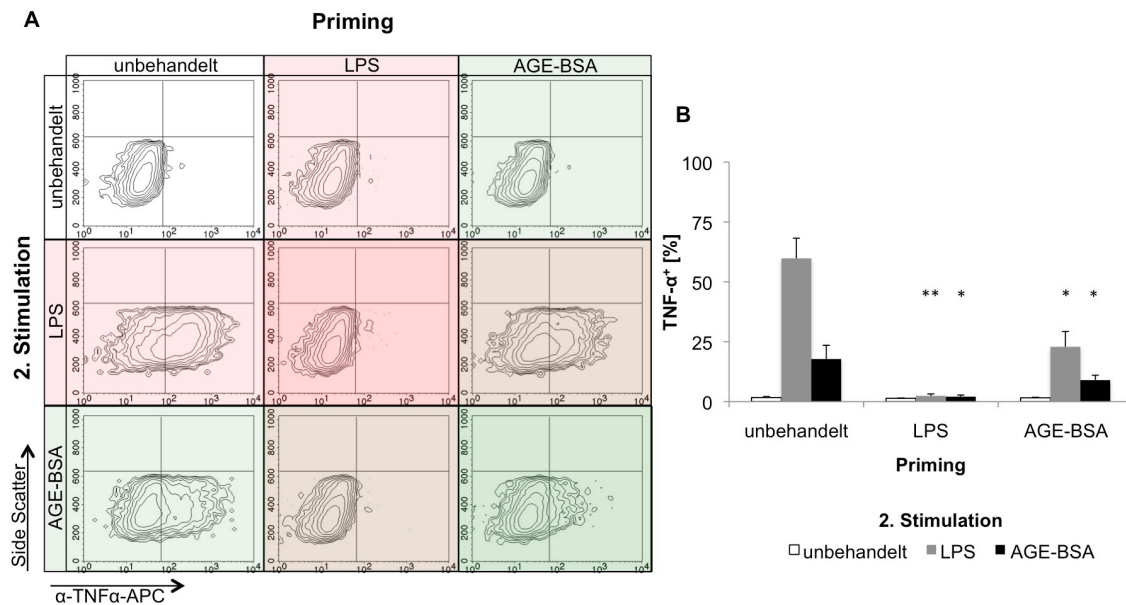


Abbildung 42: Analyse der intrazellulären TNF- α -Proteinexpression. (A) Repräsentatives Einzelexperiment der intrazellulären Färbung mit anti-TNF- α -APC, Quadrantengrenzen sind an Isotypfärbung ausgerichtet. Dichteplots zeigen *Side Scatter* (Y-Achse) gegen FL4 (X-Achse). Ansätze unter LPS-Stimulation mit roter Hinterlegung, AGE-BSA-stimulierte Ansätze in grün. (B) Zusammenfassende Darstellung von 3 unabhängigen Experimenten, dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu Ansätzen ohne Priming.

4.3.8. Nachweis der Toleranzinduktion in primären human Monozyten

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Toleranzeffekte auch in primären Monozyten ausgelöst werden können, wurde eine Versuchsreihe unter Verwendung verschiedener Primingkonzentrationen mit primären humanen Monozyten durchgeführt.

Insgesamt zeigt sich ein zu den Experimenten mit MonoMac-6-Zellen vergleichbares Bild. Eine Vorbehandlung mit LPS löst auch in primären Zellen eine Selbst- und AGE-Toleranz aus, wenngleich höhere Konzentrationen notwendig sind (1 ng/ml) (Abb. 42 A). Auffällig ist dabei die absolut im Vergleich zur Zelllinie gesehen deutlich stärkere Reaktion der primären Zellen auf eine AGE-BSA-Stimulation. Auch eine AGE-BSA-Vorbehandlung zeigt eine Toleranzinduktion, erwartungsgemäß sind dazu höhere Konzentrationen notwendig. Für eine signifikante Reduktion der TNF- α -Konzentration bei einer erneuten Stimulation mit LPS ist jedoch schon eine geringere Primingkonzentration mit AGE-BSA ausreichend (10 μ g/ml), für die Auslösung einer

Selbsttoleranz sind die gleichen Konzentrationen notwendig wie bei Verwendung der Zelllinie. Interessanterweise und abweichend von den Ergebnissen mit MonoMac-6-Zellen scheinen niedrige Konzentrationen (0,1 und 1 µg/ml) von AGE-BSA eine Selbstsensibilisierung der Zellen auszulösen, so dass die Reaktion nach erneuter Stimulation in der Tendenz eher ansteigt als abfällt (Abb.43 B, schwarze Balken).

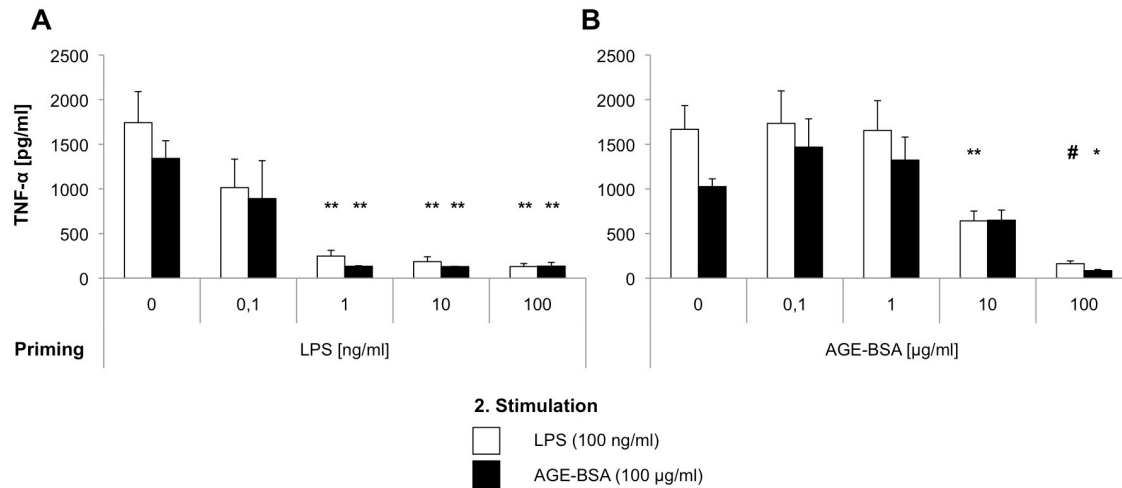


Abbildung 43: TNF-α-Konzentrationen nach Doppelstimulation primärer Monozyten. Priming mit verschiedenen Konzentrationen von LPS (A) oder AGE-BSA (B) für 24 h gefolgt von einer zweiten Stimulation (24 h) der Zellen mit LPS (100 ng/ml) oder AGE-BSA (100 µg/ml). Ergebnisse dargestellt als Mittelwert ± SEM *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, #: $p < 0,001$ im Vergleich zu Ansätze ohne Priming.

5. Diskussion

Eine schwere körperliche Traumatisierung löst eine komplexe pathophysiologische Kaskade aus, bei der die systemische Aktivierung des Immunsystems eine zentrale Stellung einnimmt. Trotz ausgezeichneter Möglichkeiten sowohl in der präklinischen als auch der klinischen Versorgung der Patienten kommt es in Folge immer noch zu komplikationshaften Therapieverläufen, insbesondere im Zusammenhang mit Infektionen. Dies deutet darauf hin, dass das Immunsystem nach der initialen Aktivierung über einen gewissen Zeitraum eine nur eingeschränkte Funktion besitzt. Die vorliegende Arbeit fasst die Ergebnisse aus zwei Beobachtungsstudien unter Einschluss von Patienten mit Polytraumatisierung sowie aus *in vitro*-Laborversuchen zusammen. Übergeordnetes Ziel der Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob und in welcher Form RAGE und seine Liganden in der Pathophysiologie der Immunreaktion nach schwerer Traumatisierung eine Rolle spielen. Die Ergebnisse zeigen eine schnelle Entstehung der plasmatischen Isoformen sRAGE und esRAGE, die im Falle von sRAGE mit dem Schweregrad der Verletzungen und im Speziellen mit Thoraxverletzungen korreliert. Beide Isoformen zeigen eine schnelle, transiente Kinetik, die der von IL-6 entspricht. Monozyten als relevante Zellen des innate Immunsystems zeigen in der Tendenz eine Verminderung des Oberflächenrezeptor und dies korreliert mit der HLA-DR-Abundanz auf den Zellen und somit mit der Immunfunktion. Neben den Rezeptorisoformen kommt es nach Trauma zu einer verzögerten Entstehung teils hoher Plasmakonzentrationen an RAGE-Liganden, insbesondere AGE-modifizierte Proteine entstehen in hoher Konzentration mit verzögerter Kinetik. Für diese konnte im Zellkultursystem schließlich nachgewiesen werden, dass AGE-modifizierte Proteine zwar initial pro-inflammatorisch wirken, sekundär jedoch eine der Endotoxintoleranz ähnelnde zelluläre Dysfunktion induzieren.

5.1. Die löslichen Isoformen von RAGE nach Trauma

Die löslichen Isoformen von RAGE, sRAGE und esRAGE, werden unmittelbar nach Trauma gebildet. Interessanterweise ist der Anstieg nur transient, schon 48h nach Trauma fallen die Konzentrationen wieder deutlich ab. Dieses Ergebnis zeigt sich in beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien und steht im Einklang mit Ergebnissen einer früheren Studie von Cohen et al., die das Phänomen der frühen Entstehung von sRAGE nach Trauma ebenfalls beschrieben haben (86). Diese frühere Studie war jedoch als Querschnittstudie nach Aufnahme der Patienten konzipiert, so dass nur zu einem einzigen Zeitpunkt nach Aufnahme eine Messung erfolgte. Zudem waren die Patienten der Cohen-Kohorte deutlich weniger schwer verletzt als die Patienten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektive (Mittelwert ISS: 17 vs.

50,1 vs. 34,1). Dennoch zeigt auch diese Arbeit schon eine Korrelation von sRAGE mit der Verletzungsschwere. Während der Plasmaspiegel von IL-6 eine vergleichbare Kinetik zeigt, sowohl auf den zeitlichen Verlauf als auch auf die Verletzungsschwere bezogen, ist die Konzentration von esRAGE zwar initial ebenfalls erhöht, ohne jedoch eine Abhängigkeit zur Verletzungsschwere zu zeigen. Die Konzentration von IL-6 wurde in dieser Arbeit als Surrogatmarker für die Präsenz eines SIRS bestimmt. Dieses pro-inflammatorische Zytokin korreliert insbesondere nach Trauma eng mit der klinischen Manifestation eines SIRS (102). Die Plasmaspiegel sowohl von sRAGE als auch esRAGE korrelieren nach Trauma mit IL-6. Zudem korrelieren die beiden RAGE-Isoformen in hohem Maß miteinander, was nicht zuletzt aufgrund der unterschiedlichen Entstehungsmechanismen überrascht. Das „klassische“ sRAGE wird durch Abspaltung des membranständigen Rezeptors durch Metalloproteinase gebildet (57), ADAM10 wurde dabei als maßgebliches Enzym identifiziert (58). Verschiedene Metalloproteinasen sind bekannt für ihre Fähigkeit, Immunrezeptoren (z.B. IL-6-R) und andere Faktoren (z.B. TNF- α) zu spalten und sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle inflammatorischer Prozesse (59). Die Aktivität der Proteasen wird dabei zum einen durch eine Familie endogener Inhibitorproteine, den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinase* (TIMP), und zum anderen über diverse Signalkaskaden reguliert. Gerade für RAGE konnte nachgewiesen werden, dass über die Aktivierung verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren die Metalloproteinaseaktivität und damit das RAGE-Shedding erhöht wird (103). Eine weitere Möglichkeit der Entstehung ist die passive Freisetzung des Rezeptors aus nekrotisch sterbenden Zellen. Aufgrund der konstitutiv hohen Expression von RAGE in diversen Zellen des Lungengewebes scheint eine Freisetzung bei verschiedenen Pathologien, die mit einem Untergang von Lungengewebe einhergehen, naheliegend. In der Tat zeigen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten retrospektiven Kohortenstudie signifikant höhere Plasmakonzentrationen von sRAGE bei Patienten mit Thoraxverletzungen unmittelbar nach Aufnahme im Vergleich zu Patienten ohne Thoraxverletzungen, die Werte von esRAGE unterscheiden sich hingegen nicht. Ebenfalls untersucht wurde zudem die diagnostische Wertigkeit der beiden Isoformen als Marker für sekundäre Lungenschädigungen. Diese sind eine häufige Komplikation bei Intensivpatienten, insbesondere bei Bedarf einer prolongierten mechanischen Ventilation. Bei traumatischen Verletzungen der Lunge oder des Thoraxbereichs und den damit verbundenen Veränderungen in der Compliance sind für eine suffiziente Oxygenierung der Patienten hohe Beatmungsdrücke erforderlich, die wiederum in gesunden Arealen der Lunge zu Baro- und Volutraumata führen können. Die daraus resultierende pulmonale Beeinträchtigung wird als *Ventilator-initiated lung injury* (VILI) bezeichnet

und stellt eine Sonderform des ALI bzw. ARDS dar (104). In einer frühen Studie von Uchida und Kollegen konnten in einem kleinen Kollektiv von Patienten mit ALI/ARDS erhöhte Plasma- und Alveolarkonzentrationen von sRAGE nachgewiesen werden (105). In der vorliegenden Arbeit sind die Konzentrationen beider Isoformen bei Patienten mit der schwersten Ausprägung eines ARDS mit einem Horovitz-Index ≤ 100 signifikant erhöht. Dieses Ergebnis deckt sich hinsichtlich sRAGE mit einer früheren Studie, die ebenfalls eine erhöhte Konzentrationen in ALI/ARDS-Patienten nachweisen konnte (83). Interessanterweise zeigt diese Studie jedoch, dass die höchsten Plasmaspiegel bei Beginn der Lungenschädigung auftreten und im Verlauf schnell absinken. Diese Kinetik entspricht dem globalen Verlauf der Plasmakonzentration in den beiden Studien dieser Arbeit. Auch dieser Aspekt deutet darauf hin, dass in der Tat ein einmaliger Insult – sei es durch das Erleiden einer schweren Verletzung oder eines Lungenschadens im Verlauf der Therapie – zu einer Freisetzung von zellulärem RAGE führt.

Bislang existieren zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen sRAGE und diversen Erkrankungen aufzeigen. Historisch und durch seine metabolischen Liganden bedingt dominieren hierbei Studien an Patienten mit Diabetes und assoziierter Erkrankungen wie Arteriosklerose. Der lösliche Rezeptor ist im Plasma von Patienten mit Diabetes erhöht und interessanterweise scheint ein Zusammenhang zum Blutzucker zu bestehen. Eine intensivste Inulintherapie führte in einer Studie an Diabetespatienten zu einer Absenkung von sRAGE, während die sRAGE-Werte für nicht-diabetische Patienten unter Insulintherapie keine Änderung zeigten (106). Neben den eher chronisch-entzündlichen Prozessen des Diabetes entsteht sRAGE aber auch durch akute systemische Entzündungszustände, unter denen die Sepsis zu den Dramatischsten zählt. Hier zeigen Studien, dass Patienten mit Sepsis höhere Konzentrationen von sRAGE im Plasma aufweisen und die Menge mit der Sterblichkeit der Patienten assoziiert ist (82, 107).

Ganz anders verhält sich die Situation für die Isoform esRAGE, die zwar nur einen geringen Anteil des löslichen RAGE ausmacht, jedoch durch einen aktiven Mechanismus entsteht. Das Protein *heterogenous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP) H1 wurde als molekularer Schalter für den Wechsel zwischen der membranständigen Isoform und der alternativen Spleißvariante identifiziert (108). Ohne Bindung von hnRNPH1 an eine distinkte 5'-Spleißsequenz kommt es zur Nutzung einer alternativen Sequenz und damit zum „Skipping“ des Exon 10, was in einer verkürzten mRNA mit alternativem Ende resultiert, die für esRAGE codiert. Die genauen Regulationsmechanismen, die der Bildung von esRAGE zugrunde liegen, sind bislang noch unverstanden, verschiedene Medikamente scheinen jedoch eine Synthese von

esRAGE zu induzieren. Für Atorvastatin konnte dieser Effekt in monozytären THP-1-Zellen nachgewiesen werden, zudem war die Konzentration von esRAGE in Patienten unter Statintherapie signifikant höher als in der Placebogruppe (109). Einen ähnlichen Effekt löst die Inhibition des *Angiotensin-Converting Enzymes 1* (ACE1) in bovinen Endothelzellen aus, auch hier kommt es zu einer gesteigerten Bildung der RAGE-Isoformen, inklusive esRAGE (110). Die Autoren konnten dieses Ergebnis auch in Patienten mit Typ 1-Diabetes übertragen, unter Therapie mit dem ACE-Hemmer Perindopril steigt die Konzentration von esRAGE im Plasma an. Schließlich erhöht auch eine Behandlung mit Rosiglitazon, einem Medikament aus der Gruppe der Insulin-Sensitizer, die Plasmaspiegel von esRAGE in Patienten mit Typ 2- Diabetes (111). Bei der letzten Studie ist der direkte kausale Zusammenhang zwischen Therapie und Anstieg von esRAGE nicht eindeutig nachweisbar. Denkbar ist hier auch, dass durch die therapeutische Reduktion des Blutzuckers sekundär die Menge an AGEs reduziert wird und so dieser Stimulus fehlt.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien, vorrangig an Patienten mit diabetischen Krankheitsbildern, legen eine positive Eigenschaft der esRAGE-Isoform nahe. Hohe Plasmaspiegel assoziieren mit einer geringeren Inzidenz eines metabolischen Syndroms (112,113) sowie einer geringeren Rate an Atherosklerose (114) und Plaquebildung in den Herzkrankgefäßen (115). Auch Studien mit nicht-diabetischen Patienten zeigen einen Zusammenhang zwischen esRAGE und dem Erkrankungsverlauf. Patienten mit Herzversagen zeigen geringere Plasmaspiegel an esRAGE, während die Konzentrationen des Liganden HMGB1 und sRAGE signifikant erhöht sind (116). Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und der ulzerativen Colitis sind die esRAGE-Plasmaspiegel ebenfalls reduziert und diese Reduktion korreliert zudem mit dem Schweregrad der Erkrankung (117). Die Fähigkeit von (niedrigem) esRAGE als prädiktiver Biomarker für kardiovaskuläre Sterblichkeit wurde zudem in einer Kohorte von Patienten mit terminalem Nierversagen nachgewiesen (118).

Wenngleich beide Isoformen durch unterschiedliche zelluläre Prozesse entstehen und die Anwesenheit sowohl negativ als auch positiv mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, so werden für beide Isoformen ähnliche Funktionen postuliert. Durch die Bindung freier Liganden fangen die löslichen Rezeptoren diese ab und verhindern damit eine Bindung an membranständige Rezeptoren und eine zelluläre Signaltransduktion. Ob dieser Mechanismus unter allen physiologischen Bedingungen statt finden kann, insbesondere unter hohem oxidativem Stress und der damit verbundenen Konformationsänderung von Proteinen, ist noch unbekannt und auch die direkte Bindung von Liganden an lösliche Rezeptoren wurde bislang nur in vereinzelten

Arbeiten beschrieben (110). Für die Quantifizierung von sRAGE mittels ELISA konnte jedoch der Nachweis erbracht werden, dass die Konzentrationsbestimmung auch in Anwesenheit (und vermutlich Bindung) verschiedener Liganden nicht beeinflusst wird (119). Im Gegensatz dazu ist die umgekehrte Situation bislang nicht untersucht worden.

Neben diesem aktiven Beitrag zur Regulation entzündlicher Prozesse ist anzunehmen, dass die Zelloberfläche eine wichtige regulatorische Ebene der AGE-RAGE-Achse darstellt. Durch die Abspaltung des Rezeptors verhindern die Zelle eine „Überaktivierung“, was in einer Perpetuierung der Entzündungsreaktion münden kann (120). Zudem gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass auch sRAGE selbst als Ligand wirkt und durch seine Bindung pro-inflammatorische Signalkaskaden (121) oder die Rekrutierung und Differenzierung von Immunzellen stimuliert (75).

5.2. Die AGE-RAGE-Achse nach Polytrauma

Die Präsenz erhöhter Blutzuckerspiegel ist ein bekanntes Phänomen in Traumapatienten. Die Ursachen liegen nach heutigem Verständnis in der stressinduzierten Ausschüttung von Hormonen wie z.B. Glukagon, (Nor-)Epinephrin und körpereigener Kortikosteroide begründet (122). Diese Hormone beeinflussen die Glukosehomeostase auf einer Vielzahl von Ebenen. Die Neubildung von Glukose wird zum einen über eine Steigerung der Glukoneogenese und zum anderen durch eine gesteigerte Glykogenolyse erhöht, zeitgleich jedoch wird die zentrale Insulinsekretion aus den Langerhans-Zellen des Pankreas reduziert und in verschiedenen Geweben (Leber und Skelettmuskel) eine Insulinresistenz induziert, zu der nicht zuletzt pro-inflammatorische Zytokine beitragen, allen voran TNF- α (123). Die als stressinduzierte Hyperglykämie (SIH) bezeichnete Komplikation nach Trauma wurde dabei in zahlreichen Studien als Faktor identifiziert, der mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist (124,125).

Auch die Patienten der in der dieser Arbeit untersuchten RiSaP-Kohorte zeigen konsistent erhöhte Blutzuckerwerte. Unter Berücksichtigung, dass in dieser Kohorte keine Patienten mit Diabetes eingeschlossen wurden, handelt es sich hierbei somit um eine klare SIH in Folge der schweren Traumatisierung. Eine Konsequenz hoher Blutzuckerspiegel in Kombination mit hohem oxidativen Stress, wie er während einer systemischen Entzündungsreaktion auftritt, ist die Entstehung von verschiedenen AGEs (126). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch nach Trauma AGE-modifizierte Proteine mit einer verzögerten Kinetik entstehen. Paradoxerweise sind die Konzentrationen der Proteine mit den spezifischen Modifikationen CML und

MG unmittelbar nach Trauma niedriger als die Werte gesunder Probanden. Ursächlich für dieses Ergebnis ist wahrscheinlich die Interaktion zwischen den Liganden und dem anfänglich in großer Konzentration vorhandenen löslichen RAGE-Rezeptor. Eine Liganden-Rezeptor-Interaktion führt dabei unter Umständen zu einer Epitopmaskierung. In der Folge können die Antikörper des Assays nicht binden und damit kein Nachweis erfolgen bzw. einen falsch-negativen bzw. niedrigen Nachweis erbringen. Die negative Korrelation zwischen sRAGE, esRAGE und den verschiedenen Liganden stützt diese Vermutung. Im Fall der AGE-modifizierten Proteine ist dieses Phänomen nicht nachweisbar, was sich wahrscheinlich in der im Vergleich 10.000fach höheren Konzentration dieses Liganden begründet. Auch für HMGB1 und S100A8 bzw. A12 zeigt sich ein solches Ergebnis nicht, die Konzentrationen liegen bei Aufnahme im Bereich der gesunden Probanden und post-operativen Kontrollpatienten. Betrachtet man die Verläufe der Konzentration von S100A8, S100A12, CML-, MG- und AGE-modifizierter Proteine im Plasma der Traumapatienten, so steigen diese alle mit einer ähnlichen, verzögerten Kinetik an.

Das Protein S100A8 wurde zusammen mit S100A9, mit dem es Heterodimere bilden kann, sowohl in Monozyten als auch neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (127). Im Gegensatz dazu ist S100A12 ausschließlich in neutrophilen Granulozyten exprimiert und bildet weder mit S100A8 noch S100A9 Komplexe, reagiert aber gleichsam auf Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (128). S100A12 wirkt *in vivo* als Chemoattraktant für Monozyten, neutrophile Granulozyten (129) und Mastzellen (130). Zudem konnte gezeigt werden, dass Mastzellen in Reaktion auf S100A12-Bindung degranulieren und proinflammatorische Zytokine produzieren (131). In Patienten mit ARDS ist sowohl die Konzentration an sRAGE als auch S100A12 in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit erhöht, was durch den massiven Influx von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum erklärt werden kann (132). Bislang konnten erhöhte S100A12-Spiegel in zahlreichen Erkrankungen mit entzündlicher Genese nachgewiesen werden, darunter auch rheumatoide Arthritis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (133). S100A8 wurde zusammen mit seinem Partner S100A9, mit dem es oftmals Heterodimere bildet, eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des lethalen Endotoxin-induzierten Schocks zugesprochen (134), wobei hier eine Bindung an den TLR4 die fatale Immunreaktion initiiert. Der gleiche Rezeptor scheint auch beim VILI zu partizipieren, zusammen mit S100A8/A9-Heterodimeren, die auch in der BAL-Flüssigkeit von Patienten mit ARDS nachweisbar sind, verschlimmert das Signal des TLR4 die Lungenschädigung im Mausmodell drastisch (135). Im Widerspruch zu diesen Publikationen steht die tierexperimentelle

Arbeit von Hiroshima und Kollegen, die eine protektive Wirkung von appliziertem S100A8 bei Lungenschädigung nachweisen können (136).

HMGB1 hingegen zeigt weder unmittelbar nach Trauma noch im Verlauf signifikante Unterschiede. Eine Publikation von Cohen und Kollegen postuliert eine frühe Freisetzung von HMGB1 nach Trauma und in Abhängigkeit von der Verletzungsschwere (86). In Anbetracht der fehlenden Kontrollgruppe in dieser Studie und der nur einmaligen Blutentnahme ist dieses Ergebnis jedoch trotz der hohen Patientenzahl von mäßiger Aussagekraft. Ursprünglich wurde HMGB1 als Mediator der Sterblichkeit im LPS-Mausmodell identifiziert (13). Mittlerweile weiß man jedoch, dass die immunologische Funktion von HMGB1 maßgeblich vom Redoxzustand von drei kritischen Cysteinen abhängt und zwischen einer Wirkung als Chemokin und der klassischen Wirkung als pro-inflammatorisches Zytokin variiert (137). Die bloße Präsenz des Proteins lässt somit ohne Kenntnis des äußeren Milieus keine Rückschlüsse auf seine Wirkung zu.

Wenige Daten existieren zur Expression von RAGE auf der Zelloberfläche von Monozyten. Eine Studie an Patienten mit Diabetes konnte eine stärkere Expression des Rezeptors im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen (138). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von primären Monozyten mit Plasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer Steigerung der Oberflächenexpression führt (139). Das für den Rezeptor codierende Gen unterliegt der Kontrolle durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (48), durch eine zelluläre Aktivierung kommt es so unter inflammatorischen Bedingungen zu einer beständigen Expressionssteigerung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Oberflächenexpression des Rezeptors ebenfalls mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Im Gegensatz zu den beschriebenen Studien zeigen die Ergebnisse der RiSaP-Studie in der Tendenz jedoch einen Abfall der Antigendichte nach Trauma im Vergleich zu gesunden Probanden, während der Anteil RAGE⁺-Monozyten sich nicht unterscheidet. Auch im weiteren Verlauf nach Trauma bleibt die Antigendichte reduziert und dies korreliert mit der Anzahl an HLA-DR-Molekülen. Schon sehr früh wurde erkannt, dass die Expression von monozytärem HLA-DR einen validen Marker für die Trauma-induzierte Immunsuppression darstellt (140). Nicht nur ungeplante Traumata führen dabei zu einem Verlust der Immunkompetenz, auch für eine gezielte Gewebeschädigung im Verlaufe von Operationen wurde dieser Effekt nachgewiesen (141). Bis heute zählt die Quantifizierung von monozytärem HLA-DR als Goldstandard zur Evaluierung der Immunfunktion von Intensivpatienten, insbesondere in der Sepsis (95). Aufgrund der notwendigen apparativen Ausstattung mit einem Durchflusszytometer hat dieser Parameter bislang jedoch keinen Einzug in die klinische Routine gehalten. Die Expression der Gene des HLA-DR-Lokus, der sich

innerhalb der MHC-Klasse II-Region auf Chromosom 6 befindet, werden durch ein zentrales Schlüsselprotein gesteuert – den *Class II Transactivator* (CIITA) (142). Auch das Gen für RAGE liegt auf dem gleichen Chromosomenabschnitt, jedoch in der MHC-Klasse III-Region, die u.a. auch Gene für Komplementfaktoren beinhaltet. In wie weit hier gemeinsame genomische Regulationsmechanismen involviert sind, muss im Zuge weiterer Untersuchungen beleuchtet werden.

Fasst man die Ergebnisse der RiSaP-Studie zusammen, so zeigt sich das Bild einer mehrphasigen Immunantwort nach Trauma unter maßgeblicher Beteiligung der RAGE-Achse. Initiiert durch die Freisetzung von DAMPs aus zerstörtem Gewebe kommt es in der „frühen Reaktion“ zu einer schnellen Aktivierung von Immunzellen, was in einer frühen Ausschüttung von Zytokinen mündet. Zeitgleich kommt es zur Entstehung von großen Mengen an löslichem RAGE, ursächlich durch passive Freisetzung aus sterbenden Zellen, durch Spaltung des Membranrezeptors nach einer Entzündungs-induzierten Aktivierung von Metalloproteasen und der Sezernierung der alternativen Spleißvariante esRAGE. Die zirkulierenden Monozyten verlieren einen Teil ihres membrangebundenen RAGE-Repertoires, was mit einem Abfall der HLA-DR-Expression einhergeht. Mit dem Eintritt in die Immunsuppression endet diese „frühe Reaktion“ und es folgt eine „sekundäre Reaktion“, die durch einen Anstieg von CRP und verschiedener RAGE-Liganden im Plasma charakterisiert werden kann. Es entsteht eine hohe Ligandenlast für RAGE, die aufgrund des Absinkens der in der frühen Reaktion vorhandenen löslichen Rezeptorformen nicht mehr abgefangen werden kann und somit auf die zellulären Rezeptoren wirkt. Bei der Ligandenlast der „sekundären Reaktion“ kann unterschieden werden in metabolische Liganden, die durch Modifikation vorhandener Proteine zur Entstehung von AGEs führt und in Liganden, die aus Immunzellen sezerniert werden. Dieses Konzept wird hier als *sustained immune response after trauma* (SIRT) postuliert.

5.3. AGEs induzieren eine *metabolic immune tolerance*

Traumapatienten durchleben nach dem initialen Insult zunächst ein SIRS, welches gefolgt wird von einer prolongierten Phase der Immunsuppression. Dabei ist die Ursache der Schädigung, ob durch einen chirurgischen Eingriff oder durch einen Unfall, von nachrangiger Bedeutung für die ausgelöste Reaktion. Zahlreiche Aspekte tragen vermutlich zum Zustand der Immunsuppression bei, darunter zirkulierende anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-4 und -10 (143), die Expansion von regulatorischen T-Zellen und *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) (144) und die Inaktivierung vorhandener Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. den Monozyten

(145). Die ursprüngliche Vorstellung einer systemischen Verschiebung des Th1-Milieus zu Gunsten eines Th2-Milieus kann dabei nicht aufrechterhalten werden (146), so dass die zelluläre Dysfunktion von Immunzellen eine zentrale Rolle einnimmt. Das Unvermögen des Immunsystems auf neu auftretende Krankheitserreger zu reagieren resultiert in diesen Patienten in einer hohen Inzidenz von infektiösen Komplikationen wie einer Sepsis (35).

Wie schon beschrieben zeichnet sich das in dieser Arbeit untersuchte prospektive Kollektiv ebenfalls durch eine reduzierte HLA-DR-Expression der zirkulierenden Monozyten aus. Dieses stellt ein elementares Merkmal der zellulären Dysfunktion dar, das Fehlen von HLA-DR resultiert in einer Unfähigkeit der Monozyten zur Antigenpräsentation und der T-Zell-Aktivierung. Die Immunsuppression nach Trauma zeigt bezogen auf die zugrundeliegenden Mechanismen und die zelluläre Manifestation starke Parallelen zur späten Phase der Sepsis (147). Auch hier sind die Patienten in einem Zustand immunologischer Dysregulation, die sie für weitere opportunistische und nosokomiale Infektionen vulnerabel zeichnet (148). Dies führt soweit, dass sowohl nach Trauma (149,150) als auch in der späten Phase der Sepsis (151,152) eine Reaktivierung der anergen Monozyten durch Gabe von GM-CSF oder IFN- γ angestrebt wurde und wird.

Interessanterweise bleibt die monozytäre Dysfunktion nach Manifestation über einen langen Zeitraum erhalten. Es stellt sich unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Lebenszeit der Monozyten im Blut von drei Tagen (153) die Frage, durch welche Mechanismen und Einflüsse die Dysfunktion in neugebildeten Zellen ausgelöst wird. Ein seit langem bekanntes Phänomen, welches die klinische Situation der anergen Monozyten immunsuppressiver Patienten widerspiegelt ist die „Endotoxintoleranz“ (154). Nach einer Stimulation mit LPS verlieren die Zellen ihre Reaktionsfähigkeit auf weitere immunologische Stimuli. LPS ist ein integraler Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, eine schwere Verletzung geht jedoch nicht zwangsläufig mit einer Infektion des Organismus, gerade im Bereich des Blutstroms, einher. Nicht zuletzt sind auch die Daten zum Vorkommen von Endotoxin im Blut von Traumapatienten uneinheitlich. Während eine der frühen Studien keinerlei Endotoxin im Patientenblut nachweisen kann (155), postulieren Kelly und Kollegen, dass 11 der untersuchten 18 Studienpatienten Endotoxinspiegel über 1pg/ml aufweisen (156), ohne jedoch dieses Ergebnis aufgrund fehlender Kontrollen in den „gesunden“ Kontext setzen zu können. Dieses Ergebnis wird zwar quantitativ von einer weiteren Studie bestätigt (157), diese zeigt jedoch auch, dass diese Konzentrationen sich nicht von der gesunden Probanden unterscheidet. Der Beitrag von LPS als kausaler Faktor der Immunsuppression ist daher mehr als fraglich.

Die Ergebnisse der RiSaP-Studie zeigen klar, dass es verzögert nach Trauma zu einem massiven Anstieg immunologischer (S100A8 und A12) und metabolischer RAGE-Liganden (AGE-modifizierten Proteine) kommt. Ziel des letzten Teils dieser Arbeit war die Evaluation, ob auch eine Aktivierung von Monozyten über RAGE, insbesondere mit AGE-modifizierten Proteinen, im Zellkultursystem zu einer Toleranzinduktion führen kann. Als „Modell“ wurde die monozytäre Zelllinie MonoMac-6 verwendet, die sich schon in zahlreichen Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bewährt hatte (97,98,158,159). Die Schlüsselergebnisse wurden ergänzend in primären humanen Monozyten bestätigt. In den Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigte sich eine Stimulierbarkeit der Zelllinie durch AGE-BSA, was in der Sezernierung eines LPS-ähnlichen Zytokinrepertoires mündet. Neben LPS wurden im Laufe der Jahre zahlreiche andere DAMPs, PAMPs und auch Zytokine identifiziert, die eine Toleranz in Monozyten auslösen können. In einem ersten Screen wurden neben verschiedenen RAGE-Liganden auch Liganden von Dectin-1 und der TLRs 2, 4 und 5 charakterisiert. Interessanterweise zeigte sich neben einer Toleranzinduktion von LPS, Flagellin (TLR5) und Pam3CSK4 (TLR2) für die verschiedenen RAGE Liganden eine solche Wirkung nur im Falle einer initialen Stimulation mit AGE-BSA. Dies erstaunt insbesondere im Hinblick auf eine Arbeit von Aneja und Kollegen, die genau diesen Effekt für HMGB- beschreibt (41). Die Studie verwendet allerdings die monozytäre Zelllinie THP-1, die zudem vor den eigentlichen Experimenten mittels IFN- γ differenziert wurde. Zudem ist das in dieser Studie verwendete HMGB1-Protein undefiniert in Bezug auf den Redoxstatus der für die Funktion kritischen Cysteine. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich definierte rekombinante Proteine verwendet, entweder in einer Konformation als Chemokin (komplett reduzierte Thiolgruppen) oder Zytokin (Disulfidbrücke zwischen Cystein 23 und 45). Für die Induktion der Toleranz mittels AGEs sind deutlich höhere Konzentrationen notwendig als bei der Verwendung mit LPS (0,1ng/ml LPS vs. 10-100 μ g/ml AGE-BSA). Diese hohen Konzentrationen sind jedoch in Patienten im Verlauf nach Trauma tatsächlich nachweisbar, was durch die Ergebnisse der RiSaP-Studie eindrücklich belegt werden kann. Interessanterweise induziert AGE-BSA nicht nur eine Selbst-, sondern auch eine Kreuztoleranz gegen andere PAMPs. Eine vergleichbare Wirkung besitzt bakterielles Lipoprotein (100) und das DAMP HSP60 (160). Im Gegensatz dazu induziert Lipoteichonsäure zwar eine Selbsttoleranz, die Zellen bleiben aber weiterhin responsiv für LPS (40). Gerade im Kontrast zur Studie mit HSP60, in der ausschließlich eine Reduktion von TNF- α und nicht anderer Zytokine gezeigt werden konnte, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine globale Toleranzinduktion für LPS und AGEs. Dies schließt in unserer Studie auch IL-10 ein. Eine Studie von Frankenberger et al. zeigte

für die LPS-induzierte Toleranz in MonoMac-6-Zellen hingegen eine Hochregulation von IL-10 und postulierte eine selektive Orchestrierung pro- und anti-inflammatorischer Gene (161). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Toleranz-induzierende Wirkung spezifisch durch die Glukosemodifikation der Proteine vermittelt wird. In Folge der Toleranzinduktion kommt es weder durch LPS noch durch AGEs zu einer verminderten Genexpression der Rezeptoren. Interessanterweise ist dies jedoch der Fall für den TLR5, dessen Expression nach Stimulation deutlich reduziert wird. Ein bemerkenswerter Unterschied zeigt sich in der Genexpression von TNF- α zwischen den Ansätzen mit LPS- und AGE-Priming. Ein Priming mit LPS führt zu einer nahezu vollständigen Abschaltung der Genexpression. Diese Stilllegung des TNF- α -Gens wird durch epigenetische Veränderungen der Chromatinstruktur im Promoterbereich und der Bindung von *Heterochromatin-binding Protein 1* (HP-1) vermittelt, was zu einer verminderten Bindung von NF- κ B in diesem Bereich führt (162). Ein zweiter Stimulus der Zellen nach AGE-Priming hingegen führt zu einem unveränderten Anstieg der TNF- α -Genexpression, was auf eine post-transkriptionelle Regulation der Toleranz hindeutet. Dies wird auch deutlich an den Ergebnissen der durchgeführten PCR-Arrays. Die Ebene, auf der sich die Toleranz abbildet ist die der intrazellulären Proteine. Sowohl ein Priming mit LPS als auch AGEs reduziert den Anteil an TNF- α^+ -Zellen, wenngleich die Toleranzinduktion durch LPS deutlich stringenter ist. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse, da die nahezu vollständige Stilllegung des TNF- α -Gens mit einem Ausbleiben der mRNA-Synthese und damit der Proteinbiosynthese korrespondiert. Trotz einer unveränderten Genexpression von TNF- α im Fall der AGE-Toleranz zeigt sich auf Proteinebene eine deutliche Reduktion, die Regulation scheint daher auf Ebene der mRNA stattzufinden. Ob dabei die Stabilität der RNA beeinflusst wird oder spezifische miRNAs mit der Proteinsynthese interferieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und muss Inhalt weiterführender Untersuchungen werden, um die molekularen Mechanismen der AGE-Toleranz aufzuklären und von anderen Toleranzen abzugrenzen. Regulatorische miRNAs spielen eine zentrale Rolle bei der Endotoxintoleranz und greifen durch negative Regulation relevanter Faktoren an vielen Stellen in die den Immunrezeptoren nachgeschaltete Signalkaskaden ein (163). Der nachgewiesene Einfluss auf verschiedene sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine legt jedoch einen eher universellen Mechanismus der Toleranzinduktion nahe. Denkbar wäre hier sicherlich auch eine Überlagerung und Synergie verschiedener regulatorischer Prozesse auf unterschiedlichsten Ebenen, angefangen bei globalen epigenetischen Mechanismen bis hin zur punktuellen Regulation

einzelner Faktoren durch miRNAs oder der Regulation von essentiellen Kofaktoren und Inhibitoren.

5.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die in der sekundären Phase nach Trauma entstehenden RAGE-Liganden sowohl aufgrund ihrer Menge als auch aufgrund der zeitlichen Kinetik das Potential besitzen, einen maßgeblichen Einfluss auf die Immunfunktion zu nehmen. Aufgrund der metabolischen Genese des in dieser Arbeit vorrangig untersuchten Liganden, der AGE-modifizierten Proteine, zeichnet sich hier eine zur Endotoxintoleranz abgrenzbare „*Metabolic immune tolerance*“ (MIT) ab.

Die Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen, die zu der beobachteten Toleranzinduktion führen, bedarf weiterer Untersuchungen. Insbesondere muss untersucht werden, ob die beobachtete Wirkung der AGEs ausschließlich über RAGE vermittelt wird oder ob auch andere Immunrezeptoren wie der TLR4 eine Rolle spielen. Zudem sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um eine mögliche vergleichbare Wirkung anderer RAGE-Liganden auf Immunzellen zu identifizieren.

Bis dato ist ungeklärt, wie sich die Liganden im Zusammenspiel mit den löslichen Rezeptorisoformen verhalten. Die Komplexbildung kann zu einer Senkung der Ligandenlast für den membrangebundenen Rezeptor führen. Ob dieses Phänomen jedoch *in vivo* unter Stresssituationen des Organismus tatsächlich auftritt, muss geklärt werden.

Neben einer therapeutischen Reaktivierung der Immunzellen mit Zytokinen wie INF- γ oder GM-CSF wäre perspektivisch eine prophylaktische Therapie denkbar, um die Induktion der Immuntoleranz schon im Vorfeld zu verhindern und somit die Inzidenz infektiöser Komplikationen im Therapieverlauf zu reduzieren. Dazu wäre die Applikation rekombinanter Fusionsproteine des Rezeptors ebenso denkbar wie die Blockade des membranständigen RAGE durch antagonistische Antikörper oder *small molecule inhibitor* wie FPS-ZM-1. Letzterer zeigt im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse bei der Therapie von Morbus Alzheimer (80) und steht möglicherweise in naher Zukunft als zugelassener RAGE-Blocker zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

Verletzungen zählen in Deutschland zu den fünf häufigsten Todesursachen und stellen eine globale Herausforderung an die moderne Medizin. Neben der eigentlichen Verletzung nimmt gerade im Kontext schwerer Mehrfachverletzungen die resultierende Immunreaktion eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie ein. Die Aktivierung erfolgt dabei auch in Abwesenheit von pathogenen Mikroorganismen durch die Freisetzung von *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Diese endogenen Signalmoleküle werden von Zellen des Körpers freigesetzt und „alarmieren“ das Immunsystem mit dem Ziel, den Schaden zu begrenzen und eine weitere Schädigung zu verhindern. Die Aktivierung des Immunsystems durch die DAMPs erfolgt über eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren, zu denen auch der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) gehört. Als Multiligandenrezeptor ist er in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Moleküle zu binden und löst in Folge distinkte zelluläre Reaktionen aus. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, in wie weit RAGE und seine Liganden in der immunologischen Pathophysiologie von Patienten nach Polytrauma eine Rolle spielen.

Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte retrospektive Studie an Biobankproben polytraumatisierter Patienten zeigt, dass es unmittelbar nach Trauma in Folge des stattfindenden *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) zu einer transienten Entstehung der löslichen Isoformen von RAGE im Plasma der Patienten kommt. In einer prospektiven Beobachtungsstudie konnte zudem nachgewiesen werden, dass die sekundäre Phase der Immunsuppression nach Trauma, die zu einer Suszeptibilität der Patienten für Infektionen führt, sowohl mit dem Absinken von monozytärem RAGE als auch mit einem drastischen Anstieg von bekannten RAGE-Liganden aus der Gruppe der Calgranuline (S100A8, S100A12) und der *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) einhergeht. Letztere entstehen vermehrt in Situationen mit hohem oxidativen Stress durch die nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen und Lipiden. Im Zellkultursystem konnte schließlich nachgewiesen werden, dass diese metabolischen Liganden die Induktion einer Selbst- und Kreuztoleranz in Monozyten bewirken – der *metabolic immune tolerance*. Dieses Phänomen ähnelt der altbekannten Endotoxintoleranz und leistet potentiell einen wesentlichen Beitrag zur Trauma-induzierten Immunsuppression.

Die AGE-RAGE-Achse repräsentiert somit einen neuen Ansatzpunkt zur prophylaktischen Therapie der komplikationsträchtigen Immundysfunktion nach schwerer Traumatisierung.

7. Summary

Traumatic injuries belong to the five leading causes of mortality in Germany and represent a global challenge for current medical treatment. Besides the actual injuries, especially in the context of life-threatening multiple traumatization the immune response plays a major role in the resulting pathophysiology. The activation of the immune system occurs in the absence of pathogenic microorganisms through the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs). These endogenous signaling molecules are released from the cells of the body and „alert“ the immune system to contain the existing and prevent further damage. DAMPs activate the immune system by binding to a variety of pattern recognition receptors including the receptor of advanced glycation endproducts (RAGE). Known as a multi-ligand receptor, RAGE is able to recognize a magnitude of different molecules and to mount distinct cellular reactions. Aim of this project was to evaluate in which extent RAGE and its ligands are involved in the immunological pathophysiology of patients after severe trauma.

The results of an initial retrospective study analyzing biobank samples of patients with severe trauma show that there is a rapid and transient increase of the soluble isoforms of RAGE in plasma in response to the systemic inflammatory response syndrom. Furthermore, a second prospective study indicates that the prolonged phase of immunosuppression after trauma, which renders the patients susceptible to infections, is accompanied by a drop of monocytic RAGE, while there is a simultaneous and dramatic increase of known RAGE ligands like calgranulins (S100A8, S100A12) and advanced glycation endproducts (AGEs). The latter are increasingly generated in conditions of high oxidative stress by non-enzymatic glycation of proteins and lipids. Finally, in monocytic cell culture, AGEs were proven to induce a self- and cross-tolerance in monocytes – a so called metabolic immune tolerance. This phenomenon mimics in part the long known endotoxin tolerance and potentially contributes to the observed trauma-induced immunosuppression.

Overall, the AGE-RAGE axis represents a novel target for preemptive therapy of the immunodysfunction after severe trauma, which is often associated with infectious complications.

8. Abkürzungsverzeichnis

AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AGE-BSA	<i>Advance Glycation Endproduct-modifiziertes bovines Serumalbumin</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
CARS	<i>Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CML	<i>N-(ε)-Carboxymethyllysine</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
esRAGE	<i>endogenous secreted RAGE</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MG	<i>Methylglyoxal</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	<i>Matrixmetalloproteinase</i>
mtDNA	<i>Mitochondriale DNA</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PI	<i>Propidiumiodid</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrom</i>
sRAGE	<i>soluble RAGE</i>
TIC	<i>Trauma-induced coagulopathy</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1. Abbildungen

Abbildung 1	Schematische Darstellung der qualitativen Dimensionen der Inflammation.	1
Abbildung 2	Ausgewählte DAMPs und PAMPs und ihre zugehörigen PRRs.	5
Abbildung 3	Schematische Darstellung der zellulären Reaktion auf die Erkennung von DAMPs und PAMPs.	8
Abbildung 4	Häufigkeitsverteilung der Ursachen, die zu einer Polytraumatisierung führen.	10
Abbildung 5	Schematische Darstellung der zentralen Eckpfeiler in der Pathophysiologie nach Polytrauma.	13
Abbildung 6	Darstellung des genomischen Lokus des <i>AGER</i> -Gens und der Zusammensetzung der Transkriptvarianten RAGE und esRAGE.	15
Abbildung 7	Schematische Darstellung des homodimerisierten RAGE, seiner Liganden und angesteuerten Signalkaskaden.	17
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Doppelstimulationsexperimente und der durchgeführten Analysen.	33
Abbildung 9	Schematische Darstellung des Protokolls zur Quantifizierung von monozytärem HLA-DR.	40
Abbildung 10	Schematische Darstellung des Protokolls zur quantitativen Bestimmung der RAGE-Oberflächenexpression.	41
Abbildung 11	Gating-Strategie bei der Analyse von Oberflächemarkern.	42
Abbildung 12	Gating-Strategie bei der Analyse des Zellzyklus.	44
Abbildung 13	Gating-Strategie bei der Erfassung der Apoptose- und Nekroserate.	45
Abbildung 14	Vergleich der Zellverteilung vor (A) und nach Selektion der Monozyten (B) anhand der FSC-SSC-Eigenschaften.	46
Abbildung 15	Schematischer Ablauf der Zytokinbestimmung mittels Cytometric Bead Array.	47
Abbildung 16	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung.	52
Abbildung 17	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung, gruppiert nach Outcome.	53
Abbildung 18	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im zeitlichen Verlauf nach Traumatisierung, gruppiert nach Schweregrad der Verletzung.	54
Abbildung 19	Korrelation der Plasmakonzentrationen der RAGE-Isoformen und IL-6.	55
Abbildung 20	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 bei Aufnahme, gruppiert nach Vorliegen einer Thoraxverletzung.	56
Abbildung 21	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Lungenschädigung.	57
Abbildung 22	Zusammenfassende Darstellung des Studienkollektivs mit Berücksichtigung von Ausschlüssen nach der Rekrutierung.	58
Abbildung 23	Verläufe des Glukosespiegels, der Leukozytenzahl und des C-reaktiven Proteins in Patienten nach Polytrauma.	60
Abbildung 24	Plasmakonzentrationen von sRAGE, esRAGE und IL-6 im Verlauf nach Trauma und initial im Vergleich zu den Kontrollgruppen.	61

Abbildung 25	Monozytäre Expression von RAGE und HLA-DR im Verlauf nach Trauma und initial im Vergleich zu den Kontrollgruppen.	63
Abbildung 26	Korrelation der Antigendichte von RAGE mit dem Anteil RAGE ⁺ -Monozyten und der Anzahl von HLA-DR-Molekülen bei Traumapatienten über alle Zeitpunkte.	64
Abbildung 27	Plasmakonzentrationen von HMGB1, S100A8 und A12 im zeitlichen Verlauf nach Trauma.	65
Abbildung 28	Plasmakonzentrationen von CML-, MG- und AGE-modifizierten Proteinen im zeitlichen Verlauf nach Trauma.	66
Abbildung 29	Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse der plasmatischen Parameter der Traumapatienten über alle Zeitpunkte.	67
Abbildung 30	Analyse der Expression von RAGE und der TLRs 2,4 und 5 auf RNA und Proteinebene.	69
Abbildung 31	Charakterisierung der zellulären Reaktion auf eine Stimulation mit LPS oder AGE-BSA.	70
Abbildung 32	Kinetik der TNF- α -Konzentration im Kultur-überstand in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer mit LPS und AGE-BSA.	71
Abbildung 33	TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen mit diversen Liganden.	72
Abbildung 34	TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen mit ausgesuchten Liganden.	73
Abbildung 35	TNF- α -Konzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen in Abhängigkeit von der Primingkonzentration.	74
Abbildung 36	Zytokinkonzentration nach zweistufiger Stimulation der Zellen in Abhängigkeit von der für das Priming verwendeten Konzentration.	75
Abbildung 37	TNF- α -Konzentration nach initialem Priming mit unmodifiziertem BSA.	76
Abbildung 38	Analyse der Apoptose/Nekrose nach Stimulation der Zellen für 2 und 24h mit LPS oder AGE-BSA.	76
Abbildung 39	Analyse des Zellzyklus nach Stimulation der Zellen für 24h mit LPS oder AGE-BSA.	77
Abbildung 40	Genexpressionsanalyse der Immunrezeptoren und TNF- α vor und nach Stimulation.	78
Abbildung 41	Ergebnisse der qPCR-Array-Experimente.	80
Abbildung 42	Analyse der intrazellulären TNF- α -Proteinexpression.	81
Abbildung 43	TNF- α -Konzentrationen nach Doppelstimulation primärer Monozyten.	82

9.2. Tabellen

Tabelle 1	Demographische Merkmale der untersuchten Studienkohorte.	51
Tabelle 2	Demographische Basisdaten der drei Gruppen des RiSaP-Kollektivs.	59
Tabelle 3	Statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppen	73

10. Literaturverzeichnis

1. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220(1):60–81.
2. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010 Mar;140(6):805–20.
3. van der Poll T, van der Poll T, Boer JD de, Boer JD de, Levi M, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis.* 2011 Jun;24(3):273–8.
4. Bone RC, Bone RC, Balk RA, Balk RA, Cerra FB, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992 Jun 1;101(6):1644–55.
5. Gray MW, Burger G, Lang BF. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2001;2(6):REVIEWS1018.
6. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):104–7.
7. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2006 Oct 10;81(1):1–5.
8. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013 Jan;13(1):24–57.
9. Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *The Journal of Immunology.* 2011 Sep 1;187(5):2626–31.
10. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology.* 2012 Sep 6;189(6):2689–95.
11. Gardiner EE, Meijer B, Andrews RK, Hoskin T, Ashcroft A, Burgess L, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev.* 2012 Sep 24.
12. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):331–42.
13. Wang H, Wang H, Bloom O, Bloom O, Zhang M, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999 Jul 9;285(5425):248–51.
14. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):191–5.
15. Yang H, Yang H, Antoine DJ, Antoine DJ, Andersson U, Andersson U, et al. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2013 May 30;93(6):865–73.

16. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol.* 2009 Aug 30;86(3):573–6.
17. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol.* 2011 Feb 18;11(3):201–12.
18. Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 2011 Jan 14;13(2):160–6.
19. Degenhardt TP, Degenhardt TP, Thorpe SR, Thorpe SR, Baynes JW, Baynes JW. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998 Nov;44(7):1139–45.
20. Kawai T, Kawai T, Akira S, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2010 Apr 20;11(5):373–84.
21. Aksoy E, Taboubi S, Torres D, Delbauve S, Hachani A, Whitehead MA, et al. The p110 δ isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol.* 2012 Sep 30;13(11):1045–54.
22. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. β -glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):38–50.
23. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol.* 2008 Feb;20(1):17–22.
24. Hornung V, Hornung V, Ellegast J, Ellegast J, Kim S, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science.* 2006 Nov 10;314(5801):994–7.
25. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar;140(6):821–32.
26. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) in Critically Ill Patients. *Clinics in Chest Medicine.* 2008 Dec;29(4):617–25.
27. Williams MA, Williams MA, Withington S, Withington S, Newland AC, Newland AC, et al. Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ex vivo. *J Infect Dis.* 1998 Nov 1;178(5):1421–33.
28. Hotchkiss RS, Hotchkiss RS, Nicholson DW, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct 13;6(11):813–22.
29. Wyen H, Lefering R, Maegele M, Brockamp T, Wafaisade A, Wutzler S, et al. The golden hour of shock - how time is running out: prehospital time intervals in Germany--a multivariate analysis of 15, 103 patients from the TraumaRegister DGU(R). *Emergency Medicine Journal.* 2013 Nov 14;30(12):1048–55.
30. Maegele M, Maegele M, Lefering R, Lefering R, Yucel N, Yucel N, et al. Early coagulopathy in multiple injury: An analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury.* 2007 Mar;38(3):298–304.

31. Weber DG, Weber DG, Bendinelli C, Bendinelli C, Balogh ZJ, Balogh ZJ. Damage control surgery for abdominal emergencies. *Br J Surg*. 2014 Jan;101(1):e109–18.
32. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Schultz MJ, Levi M, Mackersie RC, et al. Acute Coagulopathy of Trauma: Hypoperfusion Induces Systemic Anticoagulation and Hyperfibrinolysis. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2008 May;64(5):1211–7.
33. Mikhail J, Mikhail J. The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy. *AACN Clin Issues*. 1999 Feb;10(1):85–94.
34. Manson J, Manson J, Thiernemann C, Thiernemann C, Brohi K, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*. 2011 Dec 22;99(S1):12–20.
35. Wafaisade A, Lefering R, Bouillon B, Sakka SG, Thamm OC, Paffrath T, et al. Epidemiology and risk factors of sepsis after multiple trauma: An analysis of 29,829 patients from the Trauma Registry of the German Society for Trauma Surgery*. *Crit Care Med*. 2011 Apr;39(4):621–8.
36. Biswas SK, Biswas SK, Lopez-Collazo E, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009 Oct;30(10):475–87.
37. Ferlito M, Ferlito M, Romanenko OG, Romanenko OG, Ashton S, Ashton S, et al. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J Leukoc Biol*. 2001 Nov;70(5):821–9.
38. Buckley JM. Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: a review. *J Leukoc Biol*. 2006 Jun 22;80(4):731–41.
39. Mizel SB, Mizel SB. Gram-negative Flagellin-induced Self-tolerance Is Associated with a Block in Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Release from Toll-like Receptor 5. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Apr 12;277(25):22414–20.
40. Jacinto R, Jacinto R, Hartung T, Hartung T, McCall C, McCall C, et al. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6136–41.
41. Aneja RK, Chang KC, Tsung A, Burnham C-A, Sjodin H, Compton SM, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *J Leukoc Biol*. 2008 Aug 14;84(5):1326–34.
42. Sun J, Sun J, Fegan PE, Fegan PE, Desai AS, Desai AS, et al. Flagellin-induced tolerance of the Toll-like receptor 5 signaling pathway in polarized intestinal epithelial cells. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006 Oct 12;292(3):G767–78.
43. Morgan AS. Risk factors for infection in the trauma patient. *J Natl Med Assoc*. 1992 Dec;84(12):1019–23.

44. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14987–97.
45. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14998–5004.
46. Sugaya K, Ritsou E, Fukagawa T, Breitkreutz R, Matsumoto K, Benner A, et al. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics.* 1994 Sep 15;23(2):408–19.
47. Li J, Li J, Qu X, Qu X, Schmidt AM, Schmidt AM. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphotericin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):30870–8.
48. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27;272(26):16498–506.
49. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* 2007 Dec 20;22(5):1572–80.
50. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(3):1097.
51. Brett J, Brett J, Schmidt AM, Schmidt AM, Yan SD, Yan SD, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 1993 Dec 1;143(6):1699–712.
52. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells.* 2004 Feb;9(2):165–74.
53. Fehrenbach H, Fehrenbach H, Kasper M, Kasper M, Tschernig T, Tschernig T, et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998 Nov 1;44(7):1147–57.
54. Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H, et al. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 18;238(2):512–6.
55. Morbini P, Morbini P, Villa C, Villa C, Campo I, Campo I, et al. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Mod Pathol.* 2006 Aug 25.

56. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, et al. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol*. 2005 Jun 3;18(10):1385–96.
57. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Dec 12;283(51):35507–16.
58. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *The FASEB Journal*. 2008 Jun 20;22(10):3716–27.
59. Khokha R, Khokha R, Murthy A, Murthy A, Weiss A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013 Sep 1;13(9):649–65.
60. Cataldegirmen G. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF- and NF- B. *Journal of Experimental Medicine*. 2005 Feb 7;201(3):473–84.
61. Goldin A. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597–605.
62. Wang H, Yang H, Czura CJ, Sama AE, Tracey KJ. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1768–73.
63. Harris HE, Rice TW, Andersson U, Wheeler AP, Pisetsky DS, Morris PE, et al. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Apr;8(4):195–202.
64. Leclerc E, Leclerc E, Fritz G, Fritz G, Vetter SW, Vetter SW, et al. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V; 2009 Jun 1;1793(6):993–1007.
65. Mackic JB, Mackic JB, Stins M, Stins M, McComb JG, McComb JG, et al. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest*. 1998 Aug 15;102(4):734–43.
66. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The Pattern Recognition Receptor (RAGE) Is a Counterreceptor for Leukocyte Integrins: A Novel Pathway for Inflammatory Cell Recruitment. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 Nov 10;198(10):1507–15.
67. Zong H, Madden A, Ward M, Mooney MH, Elliott CT, Stitt AW. Homodimerization Is Essential for the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jul 16;285(30):23137–46.

68. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, et al. Septic Shock Is Associated with Receptor for Advanced Glycation End Products Ligation of LPS. *The Journal of Immunology*. 2011 Feb 15;186(5):3248–57.
69. Park H, Park H, Boyington JC, Boyington JC. The 1.5 Å Crystal Structure of Human Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) Ectodomains Reveals Unique Features Determining Ligand Binding. *J Biol Chem*. 2010 Dec 17;285(52):40762–70.
70. Riehl A, Bouchon A, Németh J, Facchetti F, Angel P, Weigand MA, et al. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal*. 2009;7(1):12.
71. Xue J, Xue J, Rai V, Rai V, Singer D, Singer D, et al. Advanced Glycation End Product Recognition by the Receptor for AGEs. *Structure/Folding and Design*. Elsevier Ltd; 2011 May 11;19(5):722–32.
72. Wei W, Wei W, Lampe L, Lampe L, Park S, Park S, et al. Disulfide Bonds within the C2 Domain of RAGE Play Key Roles in Its Dimerization and Biogenesis. *PLoS ONE*. 2012 Dec 17;7(12):e50736.
73. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural Basis for Pattern Recognition by the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008 Aug 13;283(40):27255–69.
74. Sarkany Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. Solution Structure of the Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE). *J Biol Chem*. 2011 Oct 21;286(43):37525–34.
75. Wang Y, Wang H, Piper MG, McMaken S, Mo X, Opalek J, et al. sRAGE Induces Human Monocyte Survival and Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2010 Jul 21;185(3):1822–35.
76. Hudson BI, Hudson BI, Kalea AZ, Kalea AZ, del Mar Arriero M, del Mar Arriero M, et al. Interaction of the RAGE Cytoplasmic Domain with Diaphanous-1 Is Required for Ligand-stimulated Cellular Migration through Activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*. 2008 Aug 12;283(49):34457–68.
77. Rai V, Maldonado AY, Burz DS, Reverdatto S, Schmidt AM, Shekhtman A. Signal Transduction in Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): SOLUTION STRUCTURE OF C-TERMINAL RAGE (ctRAGE) AND ITS BINDING TO mDia1. *J Biol Chem*. 2012 Feb 10;287(7):5133–44.
78. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt A-M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011 Dec 23;1243(1):88–102.
79. Deane R, Deane R, Yan Du S, Yan Du S, Subramanyan RK, Subramanyan RK, et al. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):907–13.
80. Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, et al. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1377–92.

81. Guo WA, Knight PR, Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2012 Jul 10;38(10):1588–98.
82. Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res.* 2008 Jun;147(1):79–83.
83. Jabaudon M, Jabaudon M, Futier E, Futier E, Roszyk L, Roszyk L, et al. Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients*. *Crit Care Med.* 2011 Mar;39(3):480–8.
84. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest.* 2004 Jun 1;113(11):1641–50.
85. Cohen MJ, Carles M, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Call MS, et al. Early Release of Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts After Severe Trauma in Humans. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care.* 2010 Jun;68(6):1273–8.
86. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care.* 2009;13(6):R174.
87. Bennett WE, Bennett WE, Cohn ZA, Cohn ZA. The isolation and selected properties of blood monocytes. *J Exp Med.* 1966 Jan 1;123(1):145–60.
88. Tan KCB, Shiu SWM, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006 Sep 13;49(11):2756–62.
89. Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, Matsuki H, Obata K-I, Hui L, et al. Development of an ELISA for esRAGE and its application to type 1 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2006 Aug;73(2):158–65.
90. Buckley ST, Ehrhardt C. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and the Lung. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010;2010(21):1–11.
91. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. 2012. pp. 2526–33.
92. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012 Aug 1;122(8):2731–40.
93. Fahy BG, Sheehy AM, Coursin DB. Glucose control in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2009 May;37(5):1769–76.

94. Dias IH, Dias IH, Griffiths HR, Griffiths HR. Oxidative stress in diabetes - circulating advanced glycation end products, lipid oxidation and vascular disease. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. 2014 Feb 6;51(2):125–7.
95. Venet F, Lepape A, Monneret G. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care*. 2011;15(5):231.
96. Ziegler-Heitbrock HW, Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Thiel E, Futterer A, Futterer A, et al. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*. 1988 Mar;41(3):456–61.
97. Haas JG, Haas JG, Baeuerle PA, Baeuerle PA, Riethmüller G, Riethmüller G, et al. Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Dec;87(24):9563–7.
98. Haas JG, Thiel C, Blömer K, Weiss EH, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock HW. Downregulation of tumor necrosis factor expression in the human Mono-Mac-6 cell line by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*. 1989 Jul;46(1):11–4.
99. Xiong Y, Xiong Y, Qiu F, Qiu F, Piao W, Piao W, et al. Endotoxin Tolerance Impairs IL-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) 4 and TGF- β -activated Kinase 1 Activation, K63-linked Polyubiquitination and Assembly of IRAK1, TNF Receptor-associated Factor 6, and I B Kinase and Increases A20 Expression. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4;286(10):7905–16.
100. Li CH. Bacterial lipoprotein-induced self-tolerance and cross-tolerance to LPS are associated with reduced IRAK-1 expression and MyD88-IRAK complex formation. *J Leukoc Biol*. 2006 Jan 13;79(4):867–75.
101. Carty M, Carty M, Goodbody R, Goodbody R, Schröder M, Schröder M, et al. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*. 2006 Sep 10;7(10):1074–81.
102. Giannoudis PV, Giannoudis PV, Harwood PJ, Harwood PJ, Loughenbury P, Loughenbury P, et al. Correlation Between IL-6 Levels and the Systemic Inflammatory Response Score: Can an IL-6 Cutoff Predict a SIRS State? *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2008 Sep;65(3):646–52.
103. Metz VV, Kojro E, Rat D, Postina R. Induction of RAGE Shedding by Activation of G Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE*. 2012 Jul 30;7(7):e41823.
104. Arora S, Singh PM, Trikha A. Ventilatory strategies in trauma patients. *J Emerg Trauma Shock*. 2014 Jan;7(1):25–31.
105. Uchida T, Uchida T, Shirasawa M, Shirasawa M, Ware LB, Ware LB, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 1;173(9):1008–15.
106. Arabi YM, Dehbi M, Rishu AH, Baturcam E, Kahoul SH, Brits RJ, et al. sRAGE in diabetic and non-diabetic critically ill patients: effects of intensive insulin therapy. *Critical Care*. BioMed Central Ltd; 2011 Aug 26;15(4):R203.

107. Brodska H, Malickova K, Valenta J, Fabio A, Drabek T. Soluble receptor for advanced glycation end products predicts 28-day mortality in critically ill patients with sepsis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013 Dec;73(8):650–60.
108. Ohe K, Watanabe T, Harada SI, Munesue S, Yamamoto Y, Yonekura H, et al. Regulation of alternative splicing of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through G-rich cis-elements and heterogenous nuclear ribonucleoprotein H. *Journal of Biochemistry*. 2010 Apr 19;147(5):651–9.
109. Tam HL, Shiu SWM, Wong Y, Chow WS, Betteridge DJ, Tan KCB. Effects of atorvastatin on serum soluble receptors for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010 Mar;209(1):173–7.
110. Forbes JM. Modulation of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products by Angiotensin-Converting Enzyme-1 Inhibition in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 Jun 29;16(8):2363–72.
111. Tan KCB, Tan KCB, Chow WS, Chow WS, Tso AWK, Tso AWK, et al. Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007 Jul 18;50(9):1819–25.
112. Koyama H, Koyama H, Shoji T, Shoji T, Yokoyama H, Yokoyama H, et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec 1;25(12):2587–93.
113. Momma H, Niu K, Kobayashi Y, Huang C, Chujo M, Otomo A, et al. Lower serum endogenous secretory receptor for advanced glycation end product level as a risk factor of metabolic syndrome among Japanese adult men: a 2-year longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Feb;99(2):587–93.
114. Peng WH, Peng WH, Jian WX, Jian WX, Li HL, Li HL, et al. Increased serum myeloid-related protein 8/14 level is associated with atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:41.
115. Peng WH, Peng WH, Lu L, Lu L, Hu J, Hu J, et al. Decreased serum esRAGE level is associated with angiographically determined coronary plaque progression in diabetic patients. *Clin Biochem*. 2009 Aug;42(12):1252–9.
116. Wang LJ, Lu L, Zhang FR, Chen QJ, De Caterina R, Shen WF. Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011 Apr;13(4):440–9.
117. Meijer B, Hoskin T, Ashcroft A, Burgess L, Keenan JI, Falvey J, et al. Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in IBD. *Journal of Crohn's and Colitis*. European Crohn's and Colitis Organisation; 2013 Nov 28;:1–8.
118. Koyama H, Koyama H, Shoji T, Shoji T, Fukumoto S, Fukumoto S, et al. Low circulating endogenous secretory receptor for AGEs predicts cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jan;27(1):147–53.

119. Lorenzi R, Lorenzi R, Grossin N, Grossin N, Lambert M, Lambert M, et al. Soluble form of receptor for advanced glycation end-products (sRAGE): do sRAGE ligands or anti-sRAGE auto-antibodies interfere with sRAGE quantification? *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. 2014 Mar;51(Pt 2):248–57.
120. Bopp C, Bopp C, Bierhaus A, Bierhaus A, Hofer S, Hofer S, et al. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Critical Care*. 2008;12(1):201.
121. Pullerits R, Brisslert M, Jonsson I-M, Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via $\beta 2$ integrin Mac-1. *Arthritis Rheum*. 2006;54(12):3898–907.
122. Collier B, Dossett LA, May AK, Diaz JJ. Glucose Control and the Inflammatory Response. *Nutrition in Clinical Practice*. 2008 Feb 1;23(1):3–15.
123. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF- α . *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2008 Jan;114(3):183–94.
124. Wahl WL, Taddonio M, Maggio PM, Arbabi S, Hemmila MR. Mean Glucose Values Predict Trauma Patient Mortality. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2008 Jul;65(1):42–8.
125. Kerby JD, Kerby JD, Griffin RL, Griffin RL, MacLennan P, MacLennan P, et al. Stress-Induced Hyperglycemia, Not Diabetic Hyperglycemia, Is Associated With Higher Mortality in Trauma. *Ann Surg*. 2012 Sep;256(3):446–52.
126. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2002 Sep;5(5):561–8.
127. Odink K, Odink K, Cerletti N, Cerletti N, Brüggen J, Brüggen J, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*. 1987 Nov;330(6143):80–2.
128. Vogl T, Pröpper C, Hartmann M, Strey A, Strupat K, van den Bos C, et al. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25291–6.
129. Yang Z, Yang Z, Tao T, Tao T, Raftery MJ, Raftery MJ, et al. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):986–94.
130. Yan WX, Yan WX, Armishaw C, Armishaw C, Goyette J, Goyette J, et al. Mast Cell and Monocyte Recruitment by S100A12 and Its Hinge Domain. *J Biol Chem*. 2008 Feb 28;283(19):13035–43.
131. Yang Z, Yang Z, Yan WX, Yan WX, Cai H, Cai H, et al. S100A12 provokes mast cell activation: A potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007 Jan;119(1):106–14.
132. Wittkowski H, Wittkowski H, Sturrock A, Sturrock A, van Zoelen MAD, van Zoelen MAD, et al. Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2007 May;35(5):1369–75.

133. Meijer B, Gearry RB, Day AS. The Role of S100A12 as a Systemic Marker of Inflammation. *International Journal of Inflammation*. 2012;2012(2):1–6.
134. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MAD, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007 Sep 2;13(9):1042–9.
135. Kuipers MT, Kuipers MT, Vogl T, Vogl T, Aslami H, Aslami H, et al. High Levels of S100A8/A9 Proteins Aggravate Ventilator-Induced Lung Injury via TLR4 Signaling. *PLoS ONE*. 2013 Jul 18;8(7):e68694.
136. Hiroshima Y, Hiroshima Y, Hsu K, Hsu K, Tedla N, Tedla N, et al. S100A8 Induces IL-10 and Protects against Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*. 2014 Feb 14.
137. Yang H, Yang H, Lundbäck P, Lundbäck P, Ottosson L, Ottosson L, et al. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of HMGB1. *Mol Med*. 2011 Nov 7;18:250–9.
138. Tam XHL, Shiu SWM, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ, Tan KCB. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. *Clin Sci*. 2010 Sep 24;120(2):81–9.
139. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;54(1):97–104.
140. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg*. 1990 Feb;77(2):204–7.
141. Hensler T, Hensler T, Hecker H, Hecker H, Heeg K, Heeg K, et al. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infection and Immunity*. 1997 Jun;65(6):2283–91.
142. Chang CH, Flavell RA. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med*. 1995 Feb 1;181(2):765–7.
143. Miller AC, Rashid RM, Elamin EM. The “T” in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. *J Trauma*. 2007 Dec;63(6):1407–17.
144. Albertsmeier M, Quaiser D, Dossow-Hanfstringl von V, Winter H, Faist E, Angele MK. Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate immunity*. 2014 Jan 7.
145. Livingston DH, Livingston DH, Appel SH, Appel SH, Wellhausen SR, Wellhausen SR, et al. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch Surg*. 1988 Nov;123(11):1309–12.
146. Heizmann O, Koeller M, Muhr G, Oertli D, Schinkel C. Th1- and Th2-type cytokines in plasma after major trauma. *J Trauma*. 2008 Dec;65(6):1374–8.

147. Hotchkiss RS, Hofer S, Monneret G, Rosenhagen C, Payen D, Nakamura H, et al. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013 Nov 15;13(12):862–74.
148. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Critical Care*. BioMed Central Ltd; 2011 Jul 28;15(4):R183.
149. Dries DJ, Dries DJ, Jurkovich GJ, Jurkovich GJ, Maier RV, Maier RV, et al. Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Surg*. 1994 Oct;129(10):1031–41–discussion1042.
150. Flohé S, Flohé S, Lendemans S, Lendemans S, Selbach C, Selbach C, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med*. 2003 Oct;31(10):2462–9.
151. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997 Jun 1;3(6):678–81.
152. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. Granulocyte–Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Oct;180(7):640–8.
153. Whitelaw DM. The intravascular lifespan of monocytes. *Blood*. 1966 Sep;28(3):455–64.
154. Golub ES, Golub ES, Weigle WO, Weigle WO. Studies on the induction of immunologic unresponsiveness. I. Effects of endotoxin and phytochemagglutinin. *J Immunol*. 1967 Jun;98(6):1241–7.
155. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, Bishop M, Mead P, Shoemaker WC, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med*. 1993 Jun;21(6):839–45.
156. Kelly JL, Kelly JL, O'Sullivan C, O'Sullivan C, O'Riordain M, O'Riordain M, et al. Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann Surg*. 1997 May;225(5):530–41–discussion541–3.
157. Endo S, Inada K, Yamada Y, Takakuwa T, Kasai T, Nakae H, et al. Plasma endotoxin and cytokine concentrations in patients with hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 1994 Jun;22(6):949–55.
158. Haas JG, Haas JG, Meyer N, Meyer N, Riethmüller G, Riethmüller G, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced in vitro desensitization by interferon-gamma. *Eur J Immunol*. 1990 May;20(5):1181–4.
159. Ziegler-Heitbrock H, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgaß P, Sternsdorf T, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem*. ASBMB; 1994;269(25):17001–4.

160. Kilmartin B, Kilmartin B, Reen DJ, Reen DJ. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol.* 2004 Jul;34(7):2041–51.
161. Frankenberger M, Frankenberger M, Pechumer H, Pechumer H, Ziegler-Heitbrock HW, Ziegler-Heitbrock HW. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm.* 1995;45(1):56–63.
162. Gazzar ME, Yoza BK, Hu JYQ, Cousart SL, McCall CE. Epigenetic Silencing of Tumor Necrosis Factor during Endotoxin Tolerance. *J Biol Chem.* 2007 Sep 7;282(37):26857–64.
163. Quinn EM, Wang J, Redmond HP. The emerging role of microRNA in regulation of endotoxin tolerance. *J Leukoc Biol.* 2012 May;91(5):721–7.

11. Anhang

Tabelle 3: Korrelation der plasmatischen Parameter der Traumapatienten (RiSaP-Studie) über alle Zeitpunkte. Analyse mittels Spearman-Rho-Verfahren, Werte in Kästchen geben Korrelationskoeffizient (oben), Signifikanz (Mitte) und Stichprobengröße (unten) an. Signifikante Korrelationen sind grün hinterlegt.

	IL6	CRP	sRAGE	esRAGE	HMGB1	S100A8	S100A12	MG	CML	AGE
IL6		-,041 ,739 68	,511 ,000 69	,444 ,000 69	,283 ,019 69	-,055 ,651 69	-,301 ,012 69	-,563 ,000 69	-,350 ,003 69	-,622 ,000 69
CRP			-,276 ,023 68	-,276 ,023 68	-,347 ,004 68	,182 ,138 68	,316 ,009 68	,213 ,081 68	,050 ,687 68	,164 ,183 68
sRAGE				,791 ,000 69	,257 ,033 69	-,190 ,119 69	-,261 ,031 69	-,467 ,000 69	-,239 ,048 69	-,459 ,000 69
esRAGE					,105 ,392 69	-,321 ,007 69	-,378 ,001 69	-,357 ,003 69	-,179 ,141 69	-,399 ,001 69
HMGB1						,435 ,000 69	,162 ,185 69	-,117 ,339 69	-,003 ,981 69	-,201 ,097 69
S100A8							,688 ,000 69	,222 ,067 69	,221 ,068 69	,144 ,237 69
S100A12								,335 ,005 69	,261 ,030 69	,278 ,021 69
MG									,593 ,000 69	,723 ,000 69
CML										,399 ,001 69
AGE										

12. Publikationsverzeichnis

12.1. Veröffentlichungen dieser Arbeit

Publikationen (peer-reviewed)

Uhle F, van den Nouland D, Little S, Menges T, Weiterer S, Szalay G, Franke J, Schnettler R, Weigand MA, Lichtenstern C. Plasmatic isoforms of Cytokeratin 18 and RAGE after severe trauma – a longitudinal cohort study. (eingereicht bei *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*)

Abstracts und Poster

Uhle F, Magel I, Weigand MA. Advanced glycation endproducts induce monocyte anergy in Mono Mac 6 cells. *Infection*. 2013 Aug; 41(Supplement 1):S30-S30

Uhle F, Magel I, Weigand MA. AGE-BSA induces immunological tolerance in the monocytic Mono Mac 6 cell line. *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. 2013.

Uhle F und Weigand MA. Role of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in the development of sepsis after polytraumatization. MBML Retreat 2010, *Universities of Giessen and Marburg Lung Center (UGMLC)*, Rauschholzhausen

12.2. Sonstige Publikationen (peer-reviewed)

Siegler BH, Weiterer S, Lichtenstern C, Stumpp D, Brenner T, Hofer S, Weigand MA, **Uhle F**. Einsatz von Biomarkern in der Sepsis: Update und Ausblick. *Anaesthesist*. (eingereicht)

Brenner T, Fleming T, **Uhle F**, Silaff S, Schmitt F, Salgado E, Ulrich A, Zimmermann S, Bruckner T, Martin E, Nawroth PP, Weigand MA, Hofer S. Methylglyoxal as a new mediator of cellular dysfunctions in septic shock. *Critical Care Med*. (eingereicht)

Weiterer S, Schulte D, Müller S, **Uhle F**, Weigand MA, Henrich M. Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. *PLoS ONE*. 2014 (**angenommen**)

Schulte A, Lichtenstern C, Henrich M, Weigand MA, **Uhle F**. Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *J Surg Res*. 2014 Jan 21. pii: S0022-4804(14)00067-5.

Arens C, **Uhle F**, Wolff M, Rohrig R, Koch C, Schulte A, et al. Effects of echinocandin preparations on adult rat ventricular cardiomyocytes : Preliminary results of an in vitro study. *Anaesthesist*. 2014 Feb;63(2):129–34.

Hecker A, **Uhle F**, Schwandner T, Padberg W, Weigand MA. Diagnostics, therapy and outcome prediction in abdominal sepsis: current standards and future perspectives. *Langenbecks Arch Surg*. 2013 Nov 2.

Lichtenstern C, Wolff M, Arens C, Klie F, Majeed RW, Henrich M, **Uhle F** et al. Cardiac effects of echinocandin preparations - three case reports. *J Clin Pharm Ther*. 2013 Oct;38(5):429–31.

Matejec R, Kayser F, Schmal F, **Uhle F**, Bodeker R-H, Maxeiner H, et al. Effects of corticotropin-releasing hormone on proopiomelanocortin derivatives and monocytic HLA-DR expression in patients with septic shock. *Peptides*. 2013 Sep;47:133–41.

Wagenlehner FM, Lichtenstern C, Rolfes C, Mayer K, **Uhle F**, Weidner W, et al. Diagnosis and management for urosepsis. *Int J Urol*. 2013 May 29;:n/a–n/a.

Lichtenstern C, Zimmermann JB, Rahbari NN, **Uhle F**, Kerber S, Weismuller K, et al. Patients suffering due to complicated peritonitis may not benefit from splenectomy: clinical data from a retrospective study. *J Surg Res*. 2011 May 15;167(2):e345–55.

Ruhrmann S, Lutz M, **Uhle F**, Rehmann H, Haverney F, Weigand M, et al. Medical care in special rescue. *Notfall Rettungsmed*. 2010;13(6):458–64.

Weth O, Weth C, Bartkuhn M, Leers J, **Uhle F**, Renkawitz R. Modular insulators: genome wide search for composite CTCF/thyroid hormone receptor binding sites. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10119.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem wissenschaftlichen Mentor Prof. Dr. med. Markus A. Weigand danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Anleitung zu verwirklichen. Die großartige Zusammenarbeit war maßgeblich geprägt durch das mir entgegengebrachte Vertrauen und den Freiraum zur Verwirklichung eigener Ideen. Insbesondere auch der enge Austausch und die Vermittlung seiner aufgeschlossenen wissenschaftlichen Philosophie haben meine wissenschaftliche Entwicklung nachhaltig beeinflusst.

Dr. med. Christoph Lichtenstern danke ich ganz herzlich für die enge Zusammenarbeit, die mir nicht zuletzt durch seine unglaubliche klinische Expertise und seine unerschütterliche Ruhe immer wieder neue Perspektiven eröffnet hat. Hier wurde das Motto „*From bench to bedside and back*“ gelebte Realität.

Für ihre großartige Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente möchte ich an dieser Stelle Frau Ilona Magel danken, insbesondere auch für ihre Spontanität und Flexibilität für Versuche „mal zwischendurch“.

Dr. med. Rainer Röhrig danke ich für die allzeit gute „Nachbarschaft“ räumlicher als auch wissenschaftlicher Natur. Trotz unserer unterschiedlichen Forschungsfelder gab es stets Schnittstellen und Gemeinsamkeit und ich habe unseren Austausch und Diskurs über Ethik, Statistik oder einfach den Kölner Karneval immer genossen.

Translationale Forschung lebt vom interdisziplinären Austausch zwischen Klinik und Forschung. Mein Dank gilt daher meinen Kolleginnen und Kollegen beider Sphären: Christoph Arens, Dr. med. Christian Koch, Dipl.-Mathematiker Raphael Majeed, Dr. med. Emmanuel Schneck, Dipl. Biologin Astrid Schulte, Dipl.-Bioinformatikerin Sandra-Natascha Ullsperger, Dr. med. Sebastian Weiterer und Dr. Katja Weismüller für die vielen gemeinsamen Projekte, wissenschaftliche Inspiration, Diskurs und gelegentlicher Zerstreuung. Auf das die Sphären in Zukunft weiter verschmelzen!

Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende und uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen, ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich Jonas und Noah für die Erkenntnis, dass die spannendsten „Experimente“ abseits des Labors im wahren Leben stattfinden.

15. Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.