

**Rolle der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase im  
Mausmodell der posttraumatischen Immunsuppression  
und konsekutiven Pneumonie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

**Diplom-Humanbiologin Nadine Ding**  
geboren am 07.11.1979 in Wolfenbüttel

**2012**

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Ulrich A. Maus

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Franz-Christoph Bange

**Tag der Promotion:** 21.02.2012

**Meiner Familie**

---

## INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	I
KURZZUSAMMENFASSUNG .....	IV
ABSTRACT .....	VI
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Trauma /Hämorrhagie .....	1
1.2 SIRS, CARS und MODS .....	1
1.2.1 SIRS.....	1
1.2.2 CARS .....	2
1.2.3 MODS .....	3
1.2.4 Zusammenspiel von SIRS, CARS und MODS .....	4
1.3 Mechanismen der pulmonalen Infektabwehr .....	5
1.3.1 Pulmonale Infektabwehr und Mustererkennung.....	5
1.3.2 Zytokine und Chemokine .....	7
1.3.3 Monozyten/Makrophagen.....	9
1.3.4 Neutrophile Granulozyten .....	10
1.4 Der MAPK-Signalweg.....	11
1.4.1 p38 MAP Kinase .....	13
1.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	15
1.5.1 Nosokomiale Pneumonie .....	16
2.FRAGESTELLUNG.....	25
3. METHODEN.....	26
3.1 Tiere .....	26
3.2 Trauma und Trauma/Hämorrhagie Induktion.....	26
3.2.1 Trauma.....	26
3.2.2 Trauma/Hämorrhagie .....	26
3.3 Blutentnahme, Hämogramm und klinische Chemie.....	28

---

3.4 Kultur und Quantifizierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	28
3.5 Infektion der Mäuse mit <i>S. pneumoniae</i> .....	28
3.6 Bronchoalveoläre Lavage.....	29
3.7 Herstellung des Lungenhomogenats .....	30
3.8 Bestimmung der Phagozytosekapazität.....	30
3.9 Western Blot.....	31
3.10 p38 MAPK Inhibitoren .....	32
3.11 <i>In vitro</i> Testung der p38 MAPK Inhibitoren .....	33
3.11.1 p38 MAPK-Inhibitor-Applikation <i>in vivo</i> .....	33
3.12 Apoptose/Nekrose Bestimmung.....	34
3.13 ELISA .....	34
3.14 Zusammenfassung des experimentellen Versuchsablaufs im T/H-Modell mit konsekutiver Pneumonie.....	35
3.15 Statistik .....	36
4. ERGEBNISSE.....	37
4.1 Charakterisierung des T/H Modells.....	37
4.1.1 Hämogramm von Kontroll-, Trauma- und T/H-Mäusen .....	37
4.1.2 Analyse klinisch-chemischer Parameter in Trauma- bzw. T/H-Mäusen.....	37
4.1.3 Erhöhte p38 MAPK Aktivität in den Lungen von T/H-Mäusen.....	39
4.1.4 Effekte von T/H auf die Zytokinfreisetzung im bronchoalveolären Kompartiment.....	41
4.1.5 Leukozytendifferenzierung in der BAL von Trauma- und T/H-Mäuse .....	43
4.2 Charakterisierung der pulmonalen Infektabwehr von <i>Streptococcus pneumoniae</i> bei Trauma bzw. T/H .....	44
4.2.1 Vorversuche mit niedriger und mittlerer Infektionsdosis.....	44
4.2.2 Charakterisierung der pulmonalen Infektabwehr von Trauma- versus T/H-Mäusen bei schwerer Pneumonie .....	45
4.2.3 Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen und peripherer Blutmonozyten und -granulozyten.....	47

---

4.2.4 Analyse von Apoptose/Nekrose-Induktion residenter Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen.....	48
4.2.5 Überleben von Trauma- und T/H-Mäusen nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> .....	49
4.3 Auswirkungen der Inhibition der p38 MAPK auf die protektive Immunabwehr der Lunge in T/H-Mäusen.....	51
4.3.1 Austestung verschiedener p38 MAPK Inhibitoren <i>in vitro</i> .....	51
4.3.2 Pharmakologische Inhibition der p38 MAPK Aktivität in den Lungen von Trauma und T/H-Mäusen .....	52
4.3.3 Effekte der p38 MAPK Inhibition auf Organfunktionsstörungen .....	53
4.3.4 Inhibition der p38 MAPK führt zu einer verbesserten Infektabwehr der Lunge gegenüber <i>S. pneumoniae</i> Infektionen .....	54
4.3.5 Inhibition der p38 MAPK verbessert die Phagozytosekapazität von Alveolarmakrophagen in T/H-Mäusen.....	56
4.3.6 Effekt der p38 MAPK Inhibition auf das Überleben von <i>S. pneumoniae</i> -infizierten T/H-Mäusen .....	57
5. DISKUSSION .....	59
5.1 Charakterisierung des T/H-Modells.....	59
5.1.2 Beteiligung der p38 MAPK an der posttraumatischen Immunsuppression ..	60
5.2 Infektion bei posttraumatischer Immunsuppression .....	61
5.2.1 Verschlechterte Phagozytoseaktivität residenter Alveolarmakrophagen nach T/H-Induktion .....	62
5.3 Effekt der Inhibition der p38 MAPK auf die posttraumatische Immunsuppression .....	63
5.3.1 Inhibition der p38 MAPK verbessert Phagozytoseleistungen residenter Alveolarmakrophagen nach T/H-Induktion.....	65
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	66
7. AUSBLICK .....	67
8. MATERIAL .....	68
8.1 Verbrauchsmaterial .....	68
8.1.1 Mikroskope.....	69

---

8.1.2 Zentrifugen .....	69
8.2 Operationszubehör .....	69
8.3 Protein Gelelektrophorese und Western Blot.....	70
8.4 Infektion, BAL, Lungenhomogenat und CFU Bestimmung .....	70
8.5 Software .....	71
8.6 Reagenzien .....	71
8.7 Narkose .....	73
8.8 Antikörper .....	73
8.9 Inhibitoren .....	73
8.10 ELISA .....	73
8.11 Zellkultur .....	74
8.12 Puffer .....	74
8.12.1 Western Blot.....	74
8.12.2 FACS Analysen .....	75
8.12.3 BAL .....	76
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	77
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION .....	90
CURRICULUM VITAE .....	91
PUBLIKATIONSLISTE .....	92
DANKSAGUNG.....	94

Anmerkung: Die Seiten 18 – 24 sind durch einen Seiten-Nummerierungsfehler in dieser Arbeit nicht vorhanden. Der Inhalt dieser Arbeit ist jedoch vollständig.

---

## Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ASK	apoptosis signal-regulating kinase
ATF	activating transcription factor
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninic Acid
bzw.	beziehungsweise
CFU	Colony forming units
CREB	cAMP-response-element-binding protein
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
G-Protein	GTP- oder Guanosin-triphosphat-bindendes Protein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HMGB	High mobility group box
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
JNK	Jun NH <sub>2</sub> terminal kinase

---

KC	Keratinocyte-derived cytokine
kD	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
min.	Minute
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
MLK 3	Mixed-lineage kinase 3
MyD 88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NLRs	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors
NP	Nosokomiale Pneumonie
o.t.	orotracheal
OD	optische Dichte
p.o.	per os
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
PMSF	Phenylmethansulphonylfluorid
PRR	Pattern recognition receptor
RLRs	RIG-1-like receptors
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotation per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEM	Standard error of the mean
SSC	Side Scatter
SV	Simian virus
T/H	Trauma/Hämorrhagie

TAK	Transforming growth factor $\beta$ -activated kinase
THB	Todd-Hewitt Broth
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor 6
Tween	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

## Kurzzusammenfassung

Polytraumapatienten erleiden häufig nach primärem Überleben ihrer schweren Verletzungen eine Phase der posttraumatischen Immunsuppression, welche diese Patienten suszeptibel für sekundäre Infektionen, insbesondere pulmonale Infektionen (Pneumonien) macht. Solcherart im Krankenhaus erworbene, nosokomiale Pneumonien führen vielfach zu schwerwiegenden septischen Verläufen, welche häufig im Multiorganversagen assoziiert mit einer hohen Letalitätsrate münden. Die pathophysiologischen und molekularen Mechanismen, welche an der Entwicklung einer Immunabwehrschwäche nach Trauma und Hämorrhagie beteiligt sind, sind bis heute unzureichend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) im Maus-Modell der Trauma/Hämorrhagie mit konsekutiver Pneumonie untersucht. Zunächst wurden Mäuse einem Trauma mittels medianer Laparotomie unterworfen, gefolgt von der Induktion einer Hämorrhagie durch Kanülierung und Blutentnahme via der Femoralarterien und -venen. Anschließend wurden die Mäuse mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert und die Keimlasten in den Lungen, die Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen sowie die Mortalitätsrate im Vergleich zu Trauma- oder Kontrollmäusen analysiert. In einzelnen Experimenten wurden Mäuse direkt nach erfolgter T/H Induktion mit einem p38 MAPK Inhibitor behandelt. Die Untersuchungen zeigten, dass T/H-Mäuse im Vergleich zu Trauma- oder Kontroll-Mäusen eine erheblich gesteigerte p38 MAPK Aktivität in ihrem Lungengewebe aufwiesen, welche mit einer attenuierten pulmonalen Erregerelimination sowie reduzierter Phagozytoseleistung residenter Alveolarmakrophagen einherging. Passend hierzu zeigten T/H-Mäuse nach Infektion mit *S. pneumoniae* eine höhere Mortalitätsrate als Kontrollmäuse und Mäuse, in welchen nur Trauma ohne Hämorrhagie induziert wurde. Die pharmakologische Inhibition der p38 MAPK nach T/H-Induktion verbesserte zwar die pulmonale Keimabwehr sowie Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen, resultierte jedoch nicht in einer verbesserten Überlebensrate von *S. pneumoniae* infizierten T/H-Mäusen. Aus den Daten der vorliegenden Studie kann zwar eine Beteiligung der p38 MAPK an der post-

traumatischen Immunsuppression im T/H-Modell der Maus abgeleitet werden, diese spielt jedoch für das Überleben einer schweren Pneumonie nur eine untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Inhibition der p38 MAPK zur Therapie der posttraumatischen Immunsuppression wahrscheinlich keinen Überlebensvorteil für Polytraumapatienten darstellt.

**Schlagwörter:** Trauma/Hämorrhagie, *Streptococcus pneumoniae*, posttraumatische Immunsuppression

## Abstract

Polytraumatized patients initially surviving their severe injuries frequently develop a post-traumatic immune suppression, causing high susceptibility to secondary infections, especially pneumonias. Nosocomial pneumonias are responsible for severe clinical manifestations and are often progressing to sepsis, multiple organ failure and high mortality rates. The underlying pathophysiological and molecular mechanisms involved in the development of this impaired host immune defense following trauma and hemorrhage are poorly understood. This work was done to investigate the role of p38 MAPK signaling in impaired lung protective immunity following trauma/hemorrhage with subsequent pneumococcal pneumonia. Therefore, trauma in mice was induced by midline laparotomy followed by cannulation of femoral arteries and veins to induce hemorrhage. Subsequently, mice were infected with *Streptococcus pneumoniae* and lung bacterial loads, phagocytosis capacity of alveolar macrophages, and mortality rates compared to trauma and control mice were determined. In selected experiments T/H mice were treated with a p38 MAPK inhibitor, or vehicle respectively. T/H mice showed high activity of p38 MAPK in their lungs compared to Control- and Trauma mice. These results correlated with impaired bacterial clearance in the lungs and reduced phagocytosis capacity of resident alveolar macrophages of T/H mice. In this line T/H mice infected with *S. pneumoniae* showed higher mortality rates than Control- and Trauma mice. The pharmacological inhibition of p38 MAPK after induction of T/H was able to restore the bacterial elimination process and the phagocytosis capacity of alveolar macrophages in the lungs, but did not result in an overall improved survival of T/H mice infected with *S. pneumoniae*. The results of this study demonstrate a contribution of p38 MAPK to post-traumatic immune suppression in the lungs of T/H mice, but at the same time inhibition of p38 MAPK had no beneficial effect on survival of T/H mice with severe pneumonia. The results of this work suggest that inhibition of p38 MAPK activity as a new therapeutic approach to ameliorate post-traumatic immunosuppression will probably not result in improved survival of polytraumatized patients.

**Keywords:** Trauma/Hemorrhage, *Streptococcus pneumoniae*, post-traumatic immunosuppression

# 1. Einleitung

## 1.1 Trauma /Hämorrhagie

Als Trauma (aus gr. τραυμα, Verletzung, Wunde) bezeichnet man in der Medizin eine Schädigung, Verletzung oder Wunde, die durch Gewalt von außen entsteht. Unter dem Begriff Polytrauma werden mehrere Verletzungen verschiedener Körperregionen bzw. Organsysteme definiert, wobei eine Verletzung oder die Kombination aus mehreren Verletzungen einen lebensbedrohlichen Zustand darstellen kann [1, 2]. Polytrauma ist die häufigste Todesursache bei Patienten im Alter zwischen 5 und 45 Jahren weltweit. Der massive Blutverlust, auch als Hämorrhagie (aus gr. αιμα, ρηγγυμι; Blut, zerreißen = Zerreißen der Blutgefäße) bezeichnet, den viele Polytraumapatienten erleiden, ist mitverantwortlich für die hohe Sterblichkeitsrate von ~ 50% [3]. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien darüber veröffentlicht, dass Trauma/Hämorrhagie zu Veränderungen im Immunsystem des Patienten führt, wobei hier sowohl spezifische als auch unspezifische Immunantworten beeinträchtigt zu sein scheinen [4-8]. So haben Patienten, die ihre schweren Verletzungen initial überleben, ein erhöhtes Risiko für sekundäre Infektionen, wie z.B. nosokomiale Pneumonien (NP) und septische Komplikationen, welche letztlich zu einem Multiorganversagen (MOV) führen können [9, 10]. Die bei Trauma/Hämorrhagie zugrunde liegenden, dysregulierten Immunabwehrmechanismen bzw. Immunparalysen sind pathomechanistisch bis dato unzureichend aufgeklärt.

## 1.2 SIRS, CARS und MODS

### 1.2.1 SIRS

Während eines hämorrhagischen Schocks führt der verminderte Blutfluss in den Organen zur Bildung von toxischen Stoffwechselprodukten sowie Sauerstoffradikalen und in der Folge zu einer vermehrten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Leukotriene, Anaphylatoxine etc.), wobei

das Ausmaß der freigesetzten Entzündungsmediatoren mit der Schwere der Verletzungen und dem Grad der Hämorrhagie korreliert [7, 11]. Die lokal freigesetzten Mediatoren können u.a. auch durch die eingeleitete Resubstitutionstherapie zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems führen, in deren Folge sich ein „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) manifestieren kann [12-14]. Das SIRS beschreibt dabei eine systemische Entzündungsantwort im Organismus, welche durch nicht-infektiöse Ereignisse (z.B. Verbrennung, Trauma und/oder Hämorrhagie) ausgelöst wird und durch Aktivierung verschiedenster inflammatorischer Mediatorsysteme gekennzeichnet ist. Ein SIRS kann sich auch in Folge einer bestehenden systemischen Infektion manifestieren, welche dann als Sepsis bezeichnet wird. Als wesentliche Kriterien für das Bestehen eines SIRS gilt das Auftreten von zumindest zwei der folgenden Symptome [15]:

- Temperatur  $> 38\text{ °C}$  oder  $< 36\text{ °C}$
- Herzfrequenz  $> 90$  Schläge/min
- Atemfrequenz  $> 20$  Atemzüge/min oder  $\text{paCO}_2 < 32$  mm Hg
- Leukozyten  $> 12.000/\text{mm}^3$  oder  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Granulozyten im peripheren Blut

Eine generalisierte Entzündungsreaktion durch das Immunsystem kann demnach in Trauma Patienten auch ohne begleitende Infektion hervorgerufen werden. Die Ausbildung eines posttraumatischen SIRS, hervorgerufen durch die erhöhte pro-inflammatorische Immunantwort, spielt eine signifikante Rolle in der Entwicklung eines MODS und stellt für polytraumatisierte Patienten ein hohes Letalitätsrisiko dar [16, 17].

### **1.2.2 CARS**

Um exzessive pro-inflammatorische Reaktionen (SIRS) einzudämmen, induziert das Immunsystem des Wirtes eine anti-inflammatorische Gegenreaktion, welche als „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS) bezeichnet wird und v.a. durch Zellen des adaptiven Immunsystems sowie einen Shift

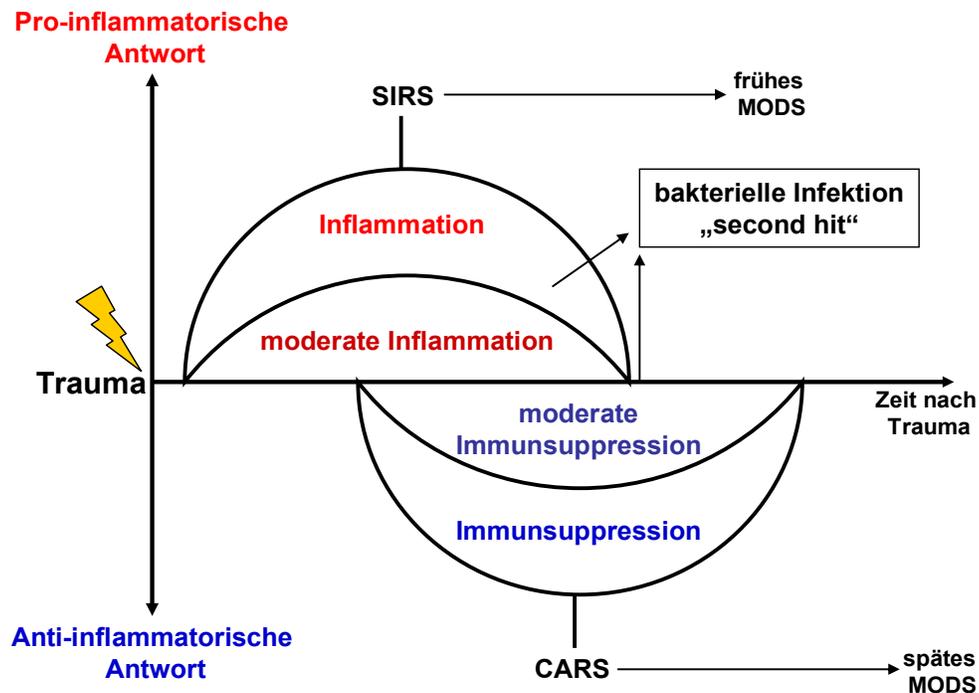
von TH1 hin zu TH2 Zytokinen wie IL-10 vermittelt wird [18, 19]. Diese Prozesse bedingen zugleich den Zustand der Immunparalyse, in der das Immunsystem nicht in der Lage ist, eine adäquate Immunantwort auf invadierende Mikroorganismen zu induzieren. Im späteren posttraumatischen Verlauf kommt es häufig zu einem Überwiegen dieser Immundysfunktion, sodass eine Prädisposition für die Entwicklung infektionsbedingter Komplikationen besteht [8]. Hieraus resultierende Infektionen können zu schwerwiegenden Komplikationen wie Sepsis und septischer Schock mit konsekutivem Multiorganversagen führen.

### **1.2.3 MODS**

Das generelle Multiorganversagen (MOV) nach Trauma/Hämorrhagie wird auch als Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) bezeichnet. Dabei wird MODS als veränderte Organfunktionen in kritisch kranken Patienten definiert, die klinische Interventionen zur Aufrechterhaltung der Organfunktionen notwendig machen [20, 21]. Der massive Blutverlust in Polytraumapatienten führt zu hämodynamischer Instabilität, Koagulopathie, verminderter Sauerstoffzufuhr sowie zur Minderdurchblutung einzelner Organsysteme, aus der sich eine zelluläre Hypoxie entwickeln kann [22]. Im weiteren Verlauf entstehen zunächst reversible Organschädigungen, die jedoch ohne intervenierende Behandlung schnell zu irreversiblen Organschäden führen können. Die Entwicklung eines MODS ist durch eine hohe Sterblichkeitsrate gekennzeichnet [13], wobei zwischen einem primär auftretenden MODS und einem sekundären MODS unterschieden werden kann. Das primäre MODS ist ein direktes Resultat aus der traumatischen Verletzung und dem Blutverlust selbst. Das sekundäre MODS resultiert nicht direkt aus den Verletzungen, sondern entsteht als Konsequenz aus der inflammatorischen Wirtsantwort nach Trauma/Hämorrhagie und steht somit meist im Zusammenhang mit SIRS [20]. Erste klinische Maßnahmen zur Behandlung von Trauma/Hämorrhagie Patienten schließen den Wundverschluss zur Blutstillung sowie frühzeitige Volumensubstitution zur Kreislaufstabilisierung und Aufrechterhaltung der Organperfusion zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung ein [23].

### **1.2.4 Zusammenspiel von SIRS, CARS und MODS**

Die initiale pro-inflammatorische Immunantwort (SIRS) nach Trauma wird hauptsächlich von den Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt, wohingegen die nachfolgende kompensatorische anti-inflammatorische Immunantwort (CARS) hauptsächlich von Zellen des adaptiven Immunsystems vermittelt wird [4-7]. Man unterscheidet zwischen einem frühen MODS und einem späten MODS, welches abhängig von der Schwere der ursprünglichen Verletzung ist und mit dem Auftreten von SIRS im Zusammenhang steht [24]. Ein massives Trauma kann eine frühe, überschießende pro-inflammatorische Antwort (SIRS) hervorrufen, woraufhin die Patienten ein frühes MODS entwickeln können oder aber die einsetzende, kompensatorische Immunantwort als Reaktion (CARS) auf die initiale pro-inflammatorische Immunreaktion führt zu einem verspätet auftretenden MODS [25]. Im so genannten „two-hit“- Szenario wird nach einem Trauma („one hit“) eine pro-inflammatorische Antwort ausgelöst, welche aber nach einem „second hit“ (z.B. einer Infektion) schnell ausufert und in der Folge zum Organversagen führen kann. Ein „second hit“ in der Phase des CARS hat aufgrund der sich etablierenden Immunparalyse ebenfalls zu meist schwerwiegende Folgen für den Patienten und kann schlussendlich zu einer Sepsis oder MODS führen [26]. So kann also eine nicht ausbalancierte systemische kompensatorische Immunantwort zu immunologischer Anergie und Immunsuppression führen, welche Polytraumapatienten sehr suszeptibel für opportunistische Infektionen machen kann [27] (Abb.1).



**Abbildung 1: SIRS, CARS und MODS.** Trauma führt zu einer übermäßigen pro-inflammatorischen Antwort (SIRS), welches zu einem frühen Organversagen führen kann. Die pro-inflammatorische Antwort wird von einer anti-inflammatorischen Antwort (CARS) kompensiert. Ein „second hit“, wie beispielsweise eine bakterielle Infektion, kann zu einer vermehrten Inflammation und spätem Organversagen führen. Abbildung verändert nach Kimura und Moore [8, 24].

### 1.3 Mechanismen der pulmonalen Infektabwehr

#### 1.3.1 Pulmonale Infektabwehr und Mustererkennung

Residente Alveolarmakrophagen der Lunge sowie *de novo* rekrutierte Neutrophile Granulozyten („Polymorphonuclear neutrophil“; PMN) repräsentieren die zentralen zellulären Komponenten der pulmonalen Infektabwehr gegen inhalierte pathogene und apathogene Agentien [28]. Sie zählen zu den professionellen Phagozyten-Subsets und sind in der Lage, als „fremd“ erkannte Mikroorganismen, aber auch Bestandteile von abgestorbenen Körperzellen, über den Prozess der Phagozytose aufzunehmen und zu degradieren. Der Prozess der Phagozytose bakterieller Erreger spielt gerade in der Frühphase einer pulmonalen Infektion mit inhalierten Krankheitserregern eine dominierende Rolle.

Die Erkennung invadierender Krankheitserreger durch professionelle Phagozyten ist ein überaus spezifischer Vorgang. Hierbei werden hoch konservierte mikrobielle Strukturen, zumeist Zellwandbestandteile von Mikroorganismen, vom Wirt erkannt. Zu diesen mikrobiellen Strukturen gehören u.a. Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Erreger, aber auch Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren sowie bakterielle DNA oder RNA Gram-positiver und –negativer Erreger. Diese Strukturen werden zusammengefasst als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet [29, 30]. Nicht nur professionelle Phagozyten, sondern auch sessile Zellen der Lunge, wie Alveolarepithelzellen besitzen eine Vielzahl von spezifischen Rezeptoren, welche diese PAMPs spezifisch erkennen können. Diese Rezeptoren werden als pattern recognition receptors (PRRs) bezeichnet [31]. PRRs können löslich, membranständig oder endosomal vorkommen. Zur Gruppe der löslichen PRRs gehören das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) und das Mannan-bindende Lektin (MBL). C-Typ Lektin Rezeptoren und einige Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind membranständig, sie erkennen ihre PAMPs extrazellulär. Einige TLRs befinden sich auch in endosomalen Kompartimenten und werden zumeist über freigesetzte mikrobielle Nukleinsäuren aktiviert. Die zytosolischen nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren finden ihre PAMPs im intrazellulären Kompartiment ebenso wie die RIG-1-like Rezeptoren (RLRs), welche hauptsächlich virale RNA erkennen können [29, 32, 33].

Die Interaktion von PAMPs mit ihren PRRs führt zur zellulären Aktivierung und nachfolgender Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren, welche der Rekrutierung und Aktivierung sessiler aber auch neu rekrutierter Entzündungszellen dienen mit dem Ziel, den pathogenen Erreger so schnell wie möglich zu eliminieren. PRRs können aber auch endogene Liganden binden, die von geschädigten bzw. nekrotischen Zellen beispielsweise bei Trauma freigesetzt werden und somit die Immunabwehr des Wirtes aktivieren. Diese Liganden werden Alarmine oder „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) genannt und insbesondere von nekrotischen Zellen freigesetzt [34, 35]. Typisches Beispiel eines solchen DAMPs ist das Chromatin-assoziierte Protein HMGB1, welches sowohl aktiv sezerniert als auch passiv freigesetzt werden kann [36]. HMGB1 bindet an mindestens drei verschiedene Rezeptoren, näm-

lich TLR2 und TLR4 sowie den“ Receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) [35]. Nach Bindung an diese Rezeptoren kommt es zur ‚downstream‘ Transkription diverser Zielgene als pro-inflammatorische Antwort auf das empfangene Signal. HMGB1 wirkt somit als Indikator für Inflammation und Organfunktionsstörungen [37].

### **1.3.2 Zytokine und Chemokine**

Zytokine sind wichtige Faktoren in der Kommunikation des Immunsystems. Zytokine sind Proteine, die als biochemische Vermittler zwischen Zellen fungieren und an Prozessen wie Zelldifferenzierung, Gewebereparatur und Immunregulation beteiligt sind. Bei angeborenen immunologischen Reaktionen werden Zytokine hauptsächlich von professionellen Phagozyten produziert, bei adaptiven Immunantworten primär von T-Lymphozyten [38]. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  wird typischerweise von aktivierten mononukleären Phagozyten produziert. TNF- $\alpha$  kann zum Beispiel die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren und sorgt somit für eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten an diese Zellen welches die Extravasation von Leukozyten zum Ort der Entzündung überhaupt erst ermöglicht. Außerdem stimuliert TNF- $\alpha$  Phagozyten und andere Entzündungszellen zur Sekretion von Chemokinen, die zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Leukozyten beitragen. TNF- $\alpha$  ist ein endogenes Pyrogen, d.h. es kann u.a. Fieber induzieren und ist gleichzeitig an der Induktion von anderen Zytokinen wie IL-1 und IL-6 beteiligt [38]. Interleukin 6 wird neben Fibroblasten, Endothelzellen und T-Zellen ebenfalls hauptsächlich von mononukleären Phagozyten der Leber synthetisiert. Es induziert in der Leber die Freisetzung von Akute-Phase Proteinen und wirkt ebenfalls als endogenes Pyrogen [38]. In der Lunge sind Alveolarmakrophagen, aber auch Epithelzellen eine wichtige IL-6 Quelle.

Zytokine und Chemokine sowie des Weiteren auch Stresshormone und viele andere humorale Faktoren sind an der Pathogenese von SIRS, CARS und MODS in Trauma Patienten beteiligt [39, 40]. Verschiedene Studien berichten von erhöhten IL-6 und TNF- $\alpha$  Spiegeln im Plasma von Ratten nach T/H Indukti-

on [12, 41], die zu einer systemischen Entzündungsreaktion und SIRS beitragen können.

Pro-inflammatorische Reaktionen auf Entzündung und Infektion werden prinzipiell von anti-inflammatorischen Zytokinen gegenreguliert. Makrophagen können u.a. IL-10 oder TGF- $\beta$  produzieren, um das Ausmaß der pro-inflammatorischen Zytokinsresponse zu kontrollieren. IL-10 inhibiert die pro-inflammatorische Zytokinproduktion von Makrophagen und reguliert zugleich auch die Expression von MHC-Klasse II Molekülen herunter [42]. Hohe anti-inflammatorische Zytokin-Spiegel von IL-10 und IL-1Ra können im Patienten zur ‚Hypoinflammation‘ führen und dadurch Patienten empfänglicher für sekundäre Infektionen machen, was gleichbedeutend ist mit einer immunsuppressiven Wirkung anti-inflammatorischer Mediatoren. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von endogenem IL-10 eine essentielle anti-inflammatorische Antwort auf pro-inflammatorische Zytokinproduktionen bei Gram-negativen und -positiven Infektionen darstellt, aber dauerhaft erhöhte IL-10 Spiegel können andererseits, wie bereits erwähnt, auch die Infektanfälligkeit des Patienten erhöhen [42-45]. So wird vermutet, dass IL-10 an der auftretenden Immunsuppression/CARS bei Hämorrhagie beteiligt ist. IL-10 moduliert u.a. die TNF- $\alpha$ -Aktivität und attenuiert SIRS [46]. IL-1Ra wird ebenfalls nach Verletzung freigesetzt und wirkt als endogener Autoregulator von IL-1, indem es mit IL-1 um die Bindung an den IL-1 Rezeptor konkurriert und somit als endogener, anti-inflammatorischer Kompetitor von IL-1 angesehen werden kann [46].

Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, welche für die Rekrutierung von Entzündungszellen wie z.B. Neutrophilen und Monozyten zum Ort der Entzündung entlang eines Chemokingradienten verantwortlich sind und zugleich auch deren Aktivierung triggern [47]. Bisher unterscheidet man vier verschiedene Klassen von Chemokinen, wobei die CXC und CC Chemokine die weitaus größten Klassen der chemotaktisch aktiven Zytokine repräsentieren. Bei CXC Chemokinen befinden sich im N-terminalen Bereich des Proteins zwei benachbarte Cysteinreste, welche durch eine andere Aminosäure voneinander getrennt werden, während bei CC Chemokinen im N-terminalen Bereich zwei Cysteinreste direkt nebeneinander liegen. CXC Chemokine wirken primär chemotaktisch auf Neutrophile (IL-8 im humanen System, bzw. MIP-2 und KC im

murinen System) [48]. CC Chemokine (MCP-1 oder MIP-1a) wirken demgegenüber primär auf die Rekrutierung mononukleärer Zellen, wie z.B. Monozyten oder Lymphozyten zum Ort der Entzündung [49].

### **1.3.3 Monozyten/Makrophagen**

Wie unter 1.3.1 erwähnt, spielen Monozyten/Makrophagen in der Initiation von Entzündungsprozessen, jedoch auch bei der Termination von Entzündung via Elimination apoptotischer und nekrotischer PMN eine wichtige Rolle. Dieser Typ professioneller Phagozyten gehört zum mononukleär-phagozytären System, welches eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielt [50]. Monozyten des peripheren Blutes sowie ihre knochenmarkstämmigen Progenitoren stellen unmittelbare Vorläuferzellen für ortständige Makrophagen und dendritische Zellen dar, welche zugleich oft als „first line defense“ der Lunge gegen inhalierte bakterielle Erreger bezeichnet werden [51, 52]. Makrophagen sind an der angeborenen Immunantwort des Wirtes auf intrazelluläre sowie extrazelluläre Pathogene beteiligt. Sie tragen zur Erkennung, Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen bei [53]. Residente Makrophagenpopulationen kommen in unterschiedlichen Organsystemen vor und werden in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation beispielsweise als Alveolarmakrophagen der Lunge bzw. Kupffer-Zellen der Leber oder Mikrogliazellen des ZNS bezeichnet. So überwachen Alveolarmakrophagen den Alveolarraum und sind maßgeblich an der Phagozytose inhalierter apathogener Partikel wie Staub, Pollen etc. beteiligt. Sobald sie auf ein Pathogen treffen, initiieren sie eine akute Entzündungsreaktion [54]. Makrophagen werden aktiviert, wenn PAMPs an ihre entsprechenden PRRs binden, woraufhin es zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen kommt, welche u.a. zur Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bzw. NF $\kappa$ B Signalmoleküle führen. Aktivierte Makrophagen induzieren durch die Sekretion unterschiedlichster Zytokine und Chemokine u.a. auch die Rekrutierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung. Zusätzlich können Makrophagen aufgenommene Antigene auch prozessieren und T-Zellen über MHC-Klasse II Moleküle präsentieren. Die Makrophagenaktivierung selbst wird über antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, TGF- $\beta$  oder Glucocorticosteroide reguliert

[54]. In einigen Studien wurde bereits festgestellt, dass es zu einer attenuierten Makrophagen/Monozyten Funktion nach Trauma kommen kann. Diese zelluläre Deaktivierung wird hauptsächlich über eine reduzierte MHC II Expression auf Zelloberflächen von Makrophagen/Monozyten hervorgerufen und korreliert mit der Schwere des Traumas und möglicherweise auch mit der Entwicklung einer Sepsis aufgrund der verminderten Antigenpräsentationskapazität dieser Zellen [11, 55].

### **1.3.4 Neutrophile Granulozyten**

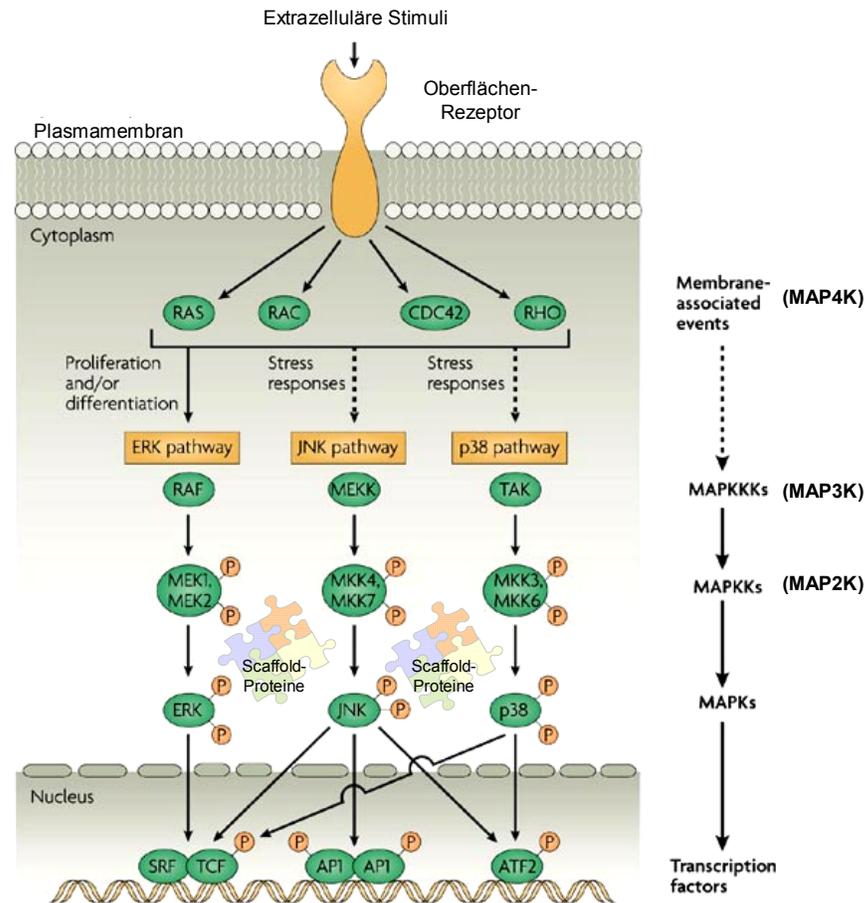
Ein zelluläres Charakteristikum akuter Entzündungsprozesse wie beispielsweise der akuten Lungenentzündung ist die frühe Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das betroffene Gewebe, welcher im weiteren Verlauf der Entzündung regelhaft die inflammatorische Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen folgt [56]. Neutrophile Granulozyten repräsentieren im peripheren Blut des Menschen die häufigste Subpopulation zirkulierender Leukozyten. Neutrophile spielen bei der Phagozytose und Abtötung pathogener Erreger aufgrund ihrer Fähigkeit zur Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie ihrer Fülle an antibakteriellen Proteinen, wie z.B. Cathepsinen, Defensinen oder Lactoferrin eine wichtige Rolle [56]. PMNs haben andererseits jedoch eine sehr kurze Lebensspanne von wenigen Tagen und gehen nach der Phagozytose mikrobieller Erreger sehr rasch in Apoptose und Nekrose über, weswegen sie kontinuierlich von ortständigen Makrophagen eliminiert werden müssen, um Gewebeverletzungen zu verhindern [49]. Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten erfolgt u.a. über Chemokine, welche sie entlang von Chemokingradienten zum Ort der Infektion leiten. Des Weiteren spielen Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie z.B. Toll-like Rezeptoren auf der Oberfläche Neutrophiler eine essentielle Rolle in der Aktivierung dieser Effektorzellpopulation. Neutrophile spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen bei Trauma [25]. Es konnte gezeigt werden, dass Neutrophile und Makrophagen von Trauma-Patienten bereits im Blut durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren vor-aktiviert sind (Priming), wodurch sowohl ihre Transmigrationsleistung als auch ihre Befähigung zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Burst) sowie anti-

mikrobieller Enzyme wie Lysozym und Elastase gesteigert ist [11, 57]. Diese vermehrte zelluläre Aktivität und gesteigerte zelluläre Akkumulation neutrophiler Granulozyten kann zu einer überschießenden systemischen Entzündung im betroffenen Organ mit konsekutivem Organschaden führen.

#### **1.4 Der MAPK-Signalweg**

Die Stimulation von Zellen durch Zytokine oder bakterielle Zellwandprodukte induziert intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse, welche zumeist über sequenzielle Phosphorylierungsschritte aktiviert werden und als Protein-Kinase-Kaskaden bezeichnet werden [58]. Auch die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Kaskade zählt zu den intrazellulären Signaltransduktionskaskaden und trägt zur Regulation der Zellfunktion bei. MAPK Signalwege sind evolutionär konservierte, zentrale Signaltransduktionswege, welche auf eine Vielzahl extrazellulärer Faktoren antworten und zelluläre Prozesse wie Genexpression, Proliferation, Differenzierung, Stress-Antworten und Apoptose regulieren [59]. Wie vorab dargestellt, sind an einer Entzündungsantwort im Allgemeinen unterschiedliche Zelltypen und Signalwege beteiligt. Eine Schlüsselrolle nehmen jedoch die Proteinkinasen ein. In der angeborenen Immunabwehr findet man kanonische Signalwege sich untereinander phosphorylierender Proteinkinasen. Dabei erkennen hochaffine Mustererkennungsrezeptoren (PRR wie z.B. Toll-like Rezeptoren) Pathogen-assoziierte molekulare Muster, woraufhin Adaptermoleküle an den zytosolischen Bereich dieser PRR rekrutiert werden, die ihrerseits die Oligomerisierung oder Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Proteinkinasen veranlassen [60]. Unterschiedlichste Rezeptor-Familien wie z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokinrezeptoren und Tyrosinkinase Rezeptoren zeigen MAPK abhängiges intrazelluläres Signalling. Die Weiterleitung von Signalen über diese Kaskaden erfolgt oft mit der Aktivierung von kleinen G-Proteinen oder anderen membranassoziierten Adapterproteinen wie ras, rac oder Cdc42, auch MAP Kinasen Kinasen Kinasen Kinasen (MAP4K) genannt [61]. Die Signale werden dann downstream über zytosolische Protein-Kinasen meist über 3-5 Stufen weitergeleitet. Auf jeder Stufe phosphoryliert die jeweilige Kinase ihre zugehörige downstream Kinase, um eine schnelle Weiterleitung des

Signals zu erreichen. So werden z.B. MAP Kinasen Kinasen Kinasen (MAP3K) von MAP4K aktiviert und aktivieren ihrerseits wiederum MAP Kinasen Kinasen (MAP2K), welche daraufhin die einzelnen MAPK aktivieren (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Erk, JNK, und p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen**

Abbildung verändert nach Liu *et al.* [62]

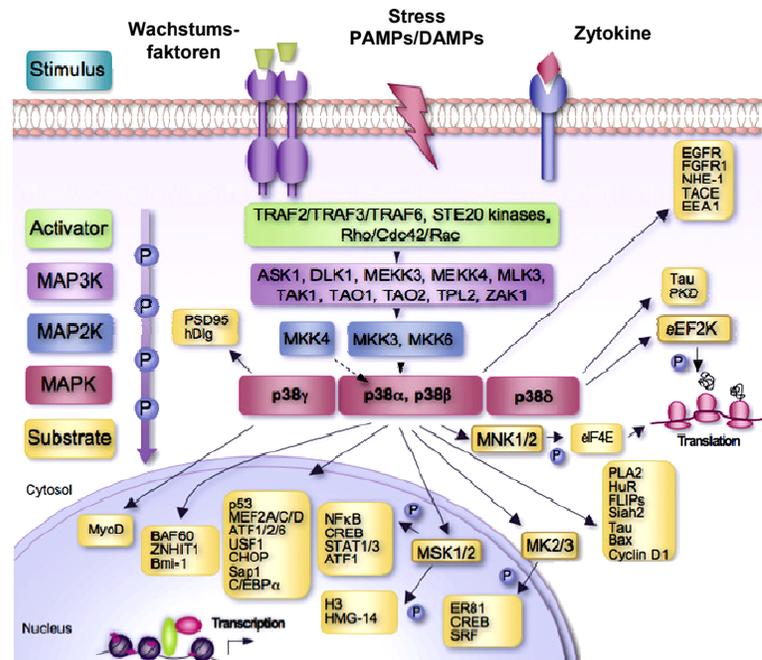
Die Aktivierung der MAPK erfolgt über die duale Phosphorylierung zweier Aminosäuren in ihrer jeweiligen Aktivierungsschleife, die für die jeweiligen Gruppen charakteristisch sind. Innerhalb des Zytoplasmas einer Zelle sind sogenannte Scaffold-Proteine dafür zuständig, die einzelnen MAPK an ihrem Platz innerhalb der Zelle zu halten, so dass eine räumliche Verknüpfung der Signalwege stattfinden kann [61]. Die Regulation der MAPK-Aktivierung erfolgt über parallel induzierbare MAPK Phosphatasen, welche die Phosphorylierung und somit die Aktivierung einzelner MAPK aufheben können [62].

Bislang wurden 6 verschiedene MAPKs in Säugetieren charakterisiert, sie wurden nach ihren Komponenten in der Signalkaskade benannt: ERK1/2 (extracellular regulated kinase), JNK/SAPK (Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase/stress activated protein kinase), p38 MAPK, ERK7/8, ERK 3/4 und die ERK 5 MAPK [59]. Die am besten untersuchten MAPK sind bis dato die p38 MAPK sowie die ERK1/2 und JNK MAPK (Abb. 2). Jede dieser MAPK kann unterschiedliche zelluläre Prozesse steuern, die jedoch häufig überlappen. Gewöhnlich spielt die ERK MAPK eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung, während die p38 MAPK und die JNK MAPK oft durch zellulären Stress aktiviert werden und daher auch stress-aktivierte Protein Kinasen (SAPKs) genannt werden [59, 63]. Durch ihre vielfältige Beteiligung an inflammatorischen und posttraumatischen Entzündungsprozessen wurde in der vorliegenden Arbeit primärer Fokus auf die p38 MAPK gelegt.

#### **1.4.1 p38 MAP Kinase**

Die p38 MAPK wird unter anderem durch Zytokine und Chemokine aber auch durch Hormone, physikalischen Stress wie osmotische Gradienten und UV Strahlung über Tyrosinkinase- und G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert [64]. Bisher wurden 4 Isoformen der p38 MAPK mit unterschiedlicher Gewebeverteilung identifiziert, nämlich die p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  Isoformen [65]. Sie wurden nach ihrem Molekulargewicht von 38 kiloDalton benannt. Die Dualkinasen MKK3 und MKK6 phosphorylieren/aktivieren die p38 MAPK an ihren Tyrosin und Threonin-Resten, eine zusätzliche Aktivierung durch MKK4 und MKK7 wird ebenfalls berichtet [61]. Die MAP2K ihrerseits können von vielen unterschiedlichen MAP3K aktiviert werden, wie z.B. ASK1, TAK1, DLK und MLK3. Kleine G-Proteine der Rho-Familie wie Rac oder Cdc42 können nach Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren auch die Aktivierung dieser Signalkaskade vermitteln [66]. Nach Aktivierung der p38 MAPK transloziert diese in den Nukleus oder aber verbleibt im Zytoplasma und aktiviert hier zytosolische Proteine wie beispielsweise Phospholipase A2 oder das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau [66]. Im Kern allerdings aktiviert sie eine Vielzahl unterschiedlichster

Transkriptionsfaktoren, wie ATF (activating transcription factor) 1, 2, 6, NFκB oder CREB (cAMP responsive element-binding protein) (Abb.3).



**Abbildung 3: Signalwege der p38 MAPK.** Unterschiedliche Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, oder Stressfaktoren können die p38 MAPK Signalkaskade aktivieren. Gezeigt werden eine Vielzahl von downstream Proteinen der p38 MAPK wie Proteinkinasen, im Zytosol lokalisierte Substrate und Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Verändert nach Cuadrado et al. [66].

Die p38 MAPK ist an vielen unterschiedlichen zellulären Antworten beteiligt. So reguliert die p38 MAPK die Expression von diversen Zytokinen und Chemokinen, im Entzündungsgeschehen wird ihr generell eine Schlüsselrolle zugeschrieben [61]. Sie vermittelt funktionelle Antworten in Makrophagen und Neutrophilen, wie z.B. den respiratorischen Burst, Chemotaxis, und Adhärenz. Außerdem ist die p38 MAPK an der Induktion von Apoptose beteiligt [64].

Mit Blick auf die Bedeutung der p38 MAPK bei Polytraumapatienten wurde in einigen Studien bereits darüber berichtet, dass ein hoher Aktivierungsstatus der p38 MAPK zu einem erhöhten Risiko für Komplikationen wie MODS und einem verlängerten Krankenhausaufenthalt führen kann [67]. Auch konnte be-

reits gezeigt werden, dass die Blockade des p38 Signalweges zu einem deutlich verbesserten Überleben in einem Sepsismodell der Maus führte [68, 69]. Die frühe Erkennung und Korrektur dieser veränderten zellulären Signalwege zu frühen Zeitpunkten im klinischen Verlauf nach Trauma könnte somit das Überleben der Patienten verbessern [70], wodurch Interventionsstrategien mit dem Ziel der Inhibition einer überschießenden Aktivierung der p38 MAPK Aktivität bei Trauma bzw. Trauma und Hämorrhagie daher möglicherweise von beträchtlicher klinischer Relevanz sind.

### **1.5 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* ist ein Gram-positives, bekapseltes Bakterium, welches zur normalen Begleitflora des Nasopharynx des Menschen gehört. Etwa 50 % der normalgesunden Bevölkerung sind mit *S. pneumoniae* kolonisiert. Die Kolonisation des Nasopharynx mit *S. pneumoniae* geht zumeist asymptomatisch einher. Demgegenüber ist *S. pneumoniae* zugleich aber auch der wichtigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, welche mit einer hohen Morbidität und (in Deutschland) mit einer Letalität von ca. 15 % einhergeht [71]. Vor diesem Hintergrund ist *S. pneumoniae* einer der wichtigsten humanpathogenen bakteriellen Krankheitserreger weltweit. Neben seiner Bedeutung als Verursacher schwerer pulmonaler Infektionen ist *S. pneumoniae* zugleich auch wesentlicher Auslöser der Mittelohrentzündung bei Kleinkindern (Otitis media) sowie der bakterieller Hirnhautentzündung (Pneumokokken-Meningitis) [72]. Infektionen mit diesem Bakterium können häufig einen invasiven Verlauf nehmen und zu einer Bakteriämie bzw. Sepsis führen. Invasive Pneumokokkeninfektionen verursachen mehr Todesfälle, als jedes andere Bakterium und gehören zu den fünf führenden Todesursachen weltweit [73]. Diese Gram-positiven Bakterien bekamen ihren Namen 1874 von Theodor Billroth aufgrund ihrer einer Perlenkette ähnelnden Morphologie. Der Name *Strepto-coccus* selbst wird hergeleitet von *streptos* (gr.), gewunden und *coccus* (gr.), die Kugel. Streptokokken sind unbeweglich, können keine Sporen bilden und sind fakultativ anaerob. *Streptococcus pneumoniae* wird häufig auch als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet, da er im histologischen Präparat zumeist diplokokkal in Erscheinung tritt. *S.*

*pneumoniae* zeigt ebenso wie vergrünende Streptokokken auf Blutagarplatten eine unvollständige oder  $\alpha$ -Hämolyse des Hämoglobins, welches zugleich auch für den mikrobiologischen Nachweis von Bedeutung ist. Pneumokokken wurden 1881 von Georg Sternberg und Louis Pasteur entdeckt und unterscheiden sich von anderen  $\alpha$ -hämolisierenden vergrünenden Streptokokken durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Galle und Optochin [74].

Die Polysaccharidkapsel der Pneumokokken ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren dieser Erreger [75]. Basierend auf Unterschieden in der Zusammensetzung dieser Polysaccharidkapsel wurden bislang mehr als 90 verschiedene Serotypen beschrieben [76], von denen ca. 20 Serotypen für mehr als 80 % der Pneumokokkeninfektionen weltweit verantwortlich sind [77]. Die Polysaccharidkapsel schützt Pneumokokken vor der Opsonophagozytose und fördert die Anheftung an die epitheliale Oberfläche im nasopharyngealen und pulmonalen Kompartiment [72, 78]. Pneumokokken besitzen zusätzlich zu ihrer Polysaccharidkapsel eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren wie das Pneumolysin [79]. Dieses 53 kD große Protein liegt als intrazelluläres Zytolysin im Zytoplasma und wird mittels Autolyse freigesetzt, um sich dann an Cholesterol in der Wirtszellmembran zu binden und zu oligomerisieren. Pneumolysin zählt zu den Transmembranporen-bildenden Cholesterol-bindenden bakteriellen Toxinen und kann die Lyse von Wirtszellen induzieren [80]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin auch als PAMP fungieren und an TLR4 der Wirtszelle binden kann, um pro-inflammatorische Immunantworten in der Wirtszelle zu induzieren [81, 82].

### **1.5.1 Nosokomiale Pneumonie**

Als eine nosokomiale Pneumonie wird jede im Krankenhaus 48 Stunden nach Aufnahme erworbene Pneumonie und alle in den ersten Tagen (bis zu 4 Wochen) nach Krankenhausentlassung erworbenen Pneumonien bezeichnet [83]. Nach Schätzungen handelt es sich bei 15 – 30 % aller nosokomialer Infektionen um Pneumonien, wobei bei nosokomialen Infektionen mit schwerem Verlauf in über 60 % der Fälle Pneumonien zugrunde liegen [83]. Besonders bei immunsupprimierten Intensivpatienten weist die nosokomiale Pneumonie eine hohe

Letalitätsrate auf [15, 84]. Die Entwicklung einer nosokomialen Pneumonie stellt eine sehr häufige, lebensbedrohliche Komplikation nach Polytrauma und hämorrhagischem Schock dar [85]. So konnte gezeigt werden, dass etwa 31 % der in einer Studie untersuchten Trauma-Patienten eine nosokomiale Infektion entwickelten [86]. Zu den Haupterregern einer nosokomialen Infektion gehören *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* ebenso wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* aber auch *Streptococcus pneumoniae* [87]. Auch Pilzinfektionen mit *Candida species* gewinnen klinisch an Bedeutung [83]. In einigen wenigen Studien wird darüber berichtet, dass Trauma bzw. T/H zu einer attenuierten Makrophagen-Aktivität verbunden mit einer reduzierten Zytokinproduktion und verschlechterten bronchoalveolären Infektabwehr führt [85, 88]. Bis heute gibt es kaum Studien über zugrunde liegende molekulare Mechanismen, welche an der Immunsuppression nach Polytrauma oder Hämorrhagie mit nachfolgender nosokomialer Pneumonie beteiligt sind.

## 2. Fragestellung

Patienten mit schweren Polytraumen, welche fast immer mit einem ausgeprägten Blutverlust (Hämorrhagie) einhergehen, weisen ungeachtet adäquater initialer Versorgung mit Resubstitutionstherapie und trotz Überlebens der direkten schweren Verletzungen eine stark erhöhte posttraumatische Sterblichkeit auf. Diese zu beobachtende sekundäre Sterblichkeit liegt häufig an auftretenden nosokomialen Infektionen, wobei die Lunge eines der am häufigsten betroffenen Zielorgane darstellt. Vorarbeiten von verschiedenen Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Trauma/Hämorrhagie eine konsekutive Immunsuppression induziert, welche verschiedene Organsysteme betrifft und wirtseigene Abwehrsysteme attenuiert [41, 89]. Die genauen Mechanismen, die eine Immunsuppression nach Trauma/Hämorrhagie auslösen, sind bis heute unzureichend charakterisiert. So fehlen bislang grundlagen-orientierte experimentelle Ansätze zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen, welche einer posttraumatischen Immunparalyse zugrunde liegen. Insbesondere immunkompromittierte Patienten (Trauma/Hämorrhagie) sowie auch immunsupprimierte Transplantatempfänger haben ein erhöhtes Risiko, an einer Pneumokokkenpneumonie zu erkranken. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde unter definierten experimentellen Bedingungen analysiert, welchen Effekt die Induktion von Trauma/Hämorrhagie auf die pulmonale Wirtsabwehr der Maus gegenüber *S. pneumoniae* hat und welcher Bedeutung die p38 MAPK in diesem Kontext zukommt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Führt Trauma/Hämorrhagie Induktion in der Maus zu einer verschlechterten pulmonalen Infektabwehr von *S. pneumoniae*?
- 2) Welche Bedeutung hat die p38 MAPK in der post-traumatischen Immunsuppression im Mausmodell der T/H mit konsekutiver Pneumonie?

## **3. Methoden**

### **3.1 Tiere**

Für alle tierexperimentellen Studien wurden weibliche C57BL/6N Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Mäuse waren bei der Versuchsdurchführung zwischen 10 und 12 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 20-22 g.

### **3.2 Trauma und Trauma/Hämorrhagie Induktion**

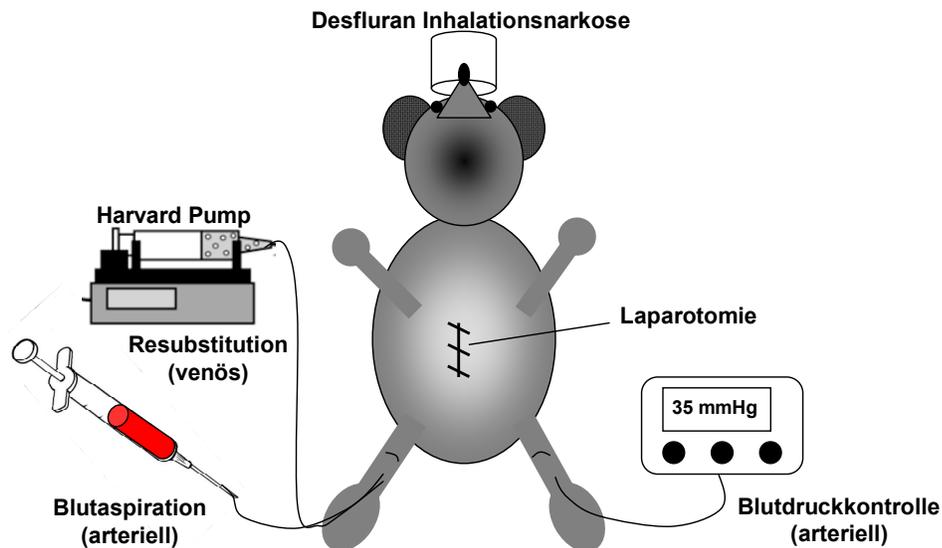
#### **3.2.1 Trauma**

Zur Induktion eines Traumas wurden Mäuse mittels inhalativer Desfluran-Narkose anästhesiert und in Rückenlage fixiert. Ventral wurde das Fell am Bauch und den hinteren Extremitäten mit einem Rasierer sorgfältig entfernt und die Haut mit Braunoderm desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde eine mediane Laparotomie von ca. 1-2 cm Länge durchgeführt und das Peritoneum freigelegt, welches ebenfalls vorsichtig unter visueller Kontrolle im Bereich der *Linea alba* durchtrennt wurde. Unmittelbar danach erfolgte der sterile Wundverschluss mit 7-0 Ethicon Faden, wobei zuerst das Peritoneum durchgängig mit einer Naht vernäht wurde und anschließend die obere Hautschicht mit einer Punktnaht verschlossen wurde.

#### **3.2.2 Trauma/Hämorrhagie**

Zur Induktion von Trauma/Hämorrhagie erfolgte zusätzlich zu der oben beschriebenen Laparotomie unter Aufrechterhaltung der Desfluran-Narkose eine Präparation beider Femoral-Arterien und -venen der hinteren Extremitäten der Maus. Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes wurden die Femoralarterien in der regio femoris beiderseits stumpf freipräpariert und proximal und distal ligiert. Beide Femoralarterien wurden mit einem Polyethylenschlauch kanüliert und mit den proximalen Ligaturen fixiert. Zusätzlich zu den Arterien wur-

de ebenfalls eine Femoralvene kanüliert und ligiert. Ein arterieller Zugang wurde an einen Blutdruck-Transducer angeschlossen und der Blutdruck der Maus mittels digitaler Blutdruckmessung kontinuierlich überwacht. Über den anderen arteriellen Zugang erfolgte mit Hilfe einer 1 ml Spritze die Blutaspiration bis zu einem mittleren arteriellen Blutdruck von 35 mm Hg, welcher dann für 60 min. aufrechterhalten wurde. Anschließend wurde den Mäusen die 4-fache Menge des aspirierten Blutvolumens in Form von Kochsalzlösung innerhalb von 30 min. über den venösen Zugang mit Hilfe einer Harvard-Pumpe infundiert (Abb. 4). Nach der Resubstitutionsphase wurden die Polyethylenschläuche aus den Arterien und der Vene entfernt, die Blutgefäße mit einem 5-0 Ethicon-Faden ligiert und die obere Haut mit einer durchgängigen Naht mittels 7-0 Ethicon Faden steril verschlossen. Die Mäuse wurden direkt nach dem Aufwachen zurück in ihre Käfige gesetzt mit freiem Zugang zu Futter und Wasser.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur T/H Induktion in der Maus.**

### **3.3 Blutentnahme, Hämogramm und klinische Chemie**

Zu definierten Zeitpunkten wurden die Mäuse durch eine Überdosis Isofluran getötet und Blut aus der *Vena cava inferior* mittels einer Lithium-Heparin Mono-vette entnommen. Für die Plasmagewinnung wurden die Blutproben bei 5000 x g 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und sofort bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das Hämogramm der Mäuse wurde aus Vollblut mittels vollautomatischer Poch100Diff (Sysmex, Leipzig, Germany) Analyse erstellt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung klinisch-chemischer Parameter wie Kreatinin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) sowie Glutamat-Pyruvat-Transaminasae (GPT) sowie Laktatdehydrogenase (LDH) (Fuji Dri-Chem 3500i, Sysmex, Leipzig, Germany) aus dem Plasma der Mäuse.

### **3.4 Kultur und Quantifizierung von *Streptococcus pneumoniae***

Für die Infektionsversuche wurde Serotyp 19 *Streptococcus pneumoniae* (EF3030) verwendet. Die Pneumokokken wurden in Todd-Hewitt Broth (THB) + 10 % FCS bis zu einer OD von 0,17 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) kultiviert. Anschließend wurden sie sofort in Kryoröhrchen à 1 ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Quantifizierung der Pneumokokken wurden serielle 1:10 Verdünnungsreihen hergestellt und 100 µl der Verdünnungen auf Blutagarplatten ausplattiert, diese wurden dann bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 18 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units; CFU) mit einem Zählstift ausgezählt.

### **3.5 Infektion der Mäuse mit *S. pneumoniae***

Kontrollmäuse sowie Trauma- und T/H-Mäuse wurden mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* infiziert. Dazu wurden die Mäuse mit Ketamin (75 mg/kg) / Tetrazolinhydrochlorid (5 mg/kg) narkotisiert und mit ihren vorderen Schneidezähnen an einem Intubationsständer aufgehängt. Anschließend wurde ein 26 G Katheter mit Hilfe eines Intubationshakens unter visueller Kontrolle orotracheal einge-

führt. Über diesen Katheter wurden die Mäuse mittels einer angesetzten Spritze mit jeweils  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  bzw.  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* in 50  $\mu$ l THB Medium intratracheal infiziert. Kontrollmäuse wurden mit 50  $\mu$ l THB Schein-infiziert (mock infection). Anschließend wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige gesetzt mit freiem Zugang zu Futter und Wasser.

### **3.6 Bronchoalveoläre Lavage**

Zur Bestimmung der Keimlasten in Lavageflüssigkeiten *S. pneumoniae*-infizierter Mäuse wurden diese mit einer Überdosis Isofluran getötet. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf einem Brett fixiert und die Trachea stumpf frei präpariert und mit einer 20 G Pastenkanüle kanüliert, welche mit einem 4-0 Faden an der Trachea fixiert wurde. Mit einer 1 ml Spritze wurden 500  $\mu$ l PBS/EDTA Aliquots durch den Katheter in die Lunge instilliert, anschließend sofort aspiriert und in einem Falconröhrchen bis zu einem Gesamtvolumen von 1,5 ml gesammelt. Anschließend wurde die Lavage fortgesetzt, bis ein weiteres BAL Volumen von 4,5 ml in einem weiteren Falconröhrchen gesammelt wurde. Je 100  $\mu$ l der 1,5 ml und 4,5 ml Aliquots der Lavageflüssigkeiten wurden in seriellen Verdünnungsreihen 1:10 mit THB verdünnt und anschließend auf Blutagarplatten ausplattiert, 18 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bebrütet und anschließend die Gesamt-CFU der BAL bestimmt. Weiterhin wurden die 1,5 ml und 4,5 ml Aliquots bei 1.400 rpm, 4°C 9 min. zentrifugiert und der Überstand des 1,5 ml Aliquots für spätere Zytokinbestimmungen abgenommen und in zwei 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt, welche direkt bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden. Der Überstand des 4,5 ml Lavage-Aliquots wurde verworfen und die Zellpellets beider Aliquots in RPMI + 10% FCS resuspendiert und zusammengeführt. Die Zellzahl in der BAL wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurde zur Herstellung eines Zytozentrifugen-Präparates verwendet. Die Zytozentrifugenpräparate wurden anschließend einer Pappenheimfärbung zur zytologischen Differenzierung der Leukozytenpopulationen unterzogen. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der einzelnen Leukozytensubsets wurde ihr jeweiliger prozentualer Anteil mit der zuvor bestimmten Gesamtzellzahl der bron-

choalveolären Lavage multipliziert. Für bestimmte *in vitro* Experimente wurden Mäuse zur Gewinnung naiver residenter Alveolarmakrophagen wie oben beschrieben, jedoch mit insgesamt 8 ml steriler PBS / EDTA-Lösung lavagiert.

### **3.7 Herstellung des Lungenhomogenats**

Zur Analyse der Keimlasten im Lungenparenchym wurde die Lunge steril aus dem Brustkorb entnommen, mit einer Schere zunächst zerkleinert und in 1 ml HBSS aufgenommen. Danach wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax Homogenisierstab homogenisiert und über einen sterilen Filter mit 1 ml HBSS in ein Falconröhrchen überführt. Von 100 µl des so gewonnenen Lungenhomogenats wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe in THB hergestellt und 100 µl des Homogenats auf Blutagarplatten für die CFU Bestimmung ausplattiert. Nach 18 h im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> wurden die CFU quantifiziert und die Keimlasten in der Gesamtlunge bestimmt.

### **3.8 Bestimmung der Phagozytosekapazität**

Zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität von Alveolarmakrophagen bzw. peripheren Blutmonozyten und -granulozyten von Trauma- bzw. T/H-Mäusen wurde ein kommerzieller Phagotest-Assay verwendet. Hierbei wurde entweder heparinisiertes Vollblut oder die mittels BAL gewonnenen Alveolarmakrophagen, aufgenommen in RPMI + 10 % FCS, mit Fluorescein (FITC)-markierten opsonisierten *Escherichia coli*-Bakterien bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Zur Charakterisierung des Effekts der p38 MAPK Inhibition auf das Phagozytosepotential von Alveolarmakrophagen wurden diese in RPMI + 10 % FCS mit dem p38 MAPK-spezifischen Inhibitor BIRB 796 (10 µM) oder Vehikel (DMSO) für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert (Blutproben: 10 min. Inkubationszeit im Wasserbad). Jeweilige Phagozytose-Kontrollansätze verblieben auf Eis. Nach der Inkubationszeit wurden die mit FITC-*E. coli* inkubierten Leukozyten auf Eis gestellt und die extrazellulär gebundene FITC Fluoreszenz mit einer Quenchlösung neutralisiert, um auf diese Weise das Fluoreszenzsignal von extrazellulär adhären, jedoch nicht phagozytierten Bakterien, zu eliminieren, während

intrazellulär lokalisierte Bakterienfluoreszenz unbeeinträchtigt blieb. Nach zwei Waschschrritten wurden kontaminierende Erythrozyten mittels Erythrozyten-Lyselösung lysiert. Durch die Zugabe DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoffe vor der durchflusszytometrischen Analyse konnten Aggregationsartefakte von Zellen und/oder Bakterien ausgeschlossen werden. Die Phagozytoseleistung der Alveolarmakrophagen bzw. peripheren Blutmonozyten oder Neutrophilen wurde anschließend im Durchflußzytometer analysiert. Hierzu wurde während der Messung ein Live Gate auf Monozyten und Granulozyten bzw. Alveolarmakrophagen gesetzt (FSC/SSC) und deren FITC-Fluoreszenz sowie darauf basierend der prozentuale Anteil der phagozytierenden Leukozytenpopulationen ermittelt.

### **3.9 Western Blot**

Die Aktivierung der p38 MAPK in den Lungen von Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen wurde mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurden Trauma- oder T/H-Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Operation mit einer Überdosis Isofluran getötet, die Lungen steril entnommen und sofort auf Trockeneis schockgefroren. Mit Hilfe des Ultra-Turrax wurde das Gewebe in 1 ml HBSS homogenisiert und danach durch einen cell strainer filtriert und in Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 30 min. auf Eis inkubiert und alle 10 min. mittels „Vortex“ gut resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 25 min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen, in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurde ein BCA Protein Assay nach Protokoll verwendet.

Es wurden je Probe 25 µg Protein 1:2 mit Ladepuffer (nach Laemmli [90]) verdünnt und 5 Minuten bei 99 °C denaturiert. Die Proteine wurden auf einem 12,5 %igen Acrylamidgel elektrophoretisch bei 120 V für 55 min. aufgetrennt. Nach der Separation wurden die Proteinbanden bei 120 mA/Gel für 50 min. mithilfe von Transferpuffer auf eine Immobilon-PVDF-Membran transferiert und anschließend in PBS gewaschen und kurz in Methanol getaucht. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in 0,05 % PBST für eine Stunde bei Raumtempera-

tur geblockt. Danach wurde diese zweimal in 0,05 % PBST gewaschen. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper (entsprechend in 1 % Milchpulver / 0.05 % PBST verdünnt) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit 0.05 % PBST wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper (in 1 % Milchpulver / 0.05 % PBST verdünnt) inkubiert. Anschließend an einen dreifachen Waschschrift mit 0,05 % PBST wurde ECL plus Reagenz auf die Membran gegeben und die Detektion der Banden über die Chemilumineszenz digital am Chemi Smart 5000 durchgeführt. Zur Analyse weiterer Proteine wurde die Membran für 30 min bei 50 °C unter ständiger Bewegung in Stripping-Solution gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit 0,05 % PBST wurde für die Detektion weiterer Proteine mit nachfolgenden, primären Antikörpern wie oben bereits erläutert begonnen. Abschließend wurden die Blots nach Herstellerangaben des ECL Plus Western Blotting Detection Systems digital analysiert und die Bandenintensitäten mit dem Chemi Smart 5000 und der Software Chemi-Capt bestimmt. Die Auswertung der einzelnen Bandenintensitäten erfolgte mit der Software Bio1D.

### **3.10 p38 MAPK Inhibitoren**

Der p38 MAPK Inhibitor SB203580 gehört zur Gruppe der Pyridinylimidazol Inhibitoren und wird bereits seit vielen Jahren eingesetzt [91]. SB203580 wurde ursprünglich als pharmakologisches Werkzeug entwickelt, um molekulare Ziele zu entdecken, die an der Zytokinregulation beteiligt sind [92]. Dieser p38 MAPK Inhibitor konkurriert kompetitiv mit ATP um die ATP-Bindungsstelle an diesem Enzym und verringert somit die Aktivität der p38 MAPK. Er ist hochspezifisch für die p38  $\alpha$  als auch p38  $\beta$  Isoformen. Im Gegensatz dazu gehört der neuere p38 MAPK Inhibitor BIRB 796 zur Gruppe der Diaryl-Urea Inhibitoren und verhindert die Bindung von ATP an die ATP-Bindungsstelle der p38 MAPK durch eine Konformationsänderung an dieser Stelle [93]. Somit können upstream Kinasen wie MKK 6 oder MKK4 die p38 MAPK nicht weiter phosphorylieren und somit auch nicht aktivieren. BIRB796 kann alle p38 Isoformen hochspezifisch hemmen, wobei BIRB 796 für p38 $\alpha$  und  $\beta$  eine höhere Selektivität besitzt als für p38 $\gamma$  und  $\delta$  [94]. Durch die geschilderte Konformationsänderung in der ATP-

Bindungsstelle und eine verlangsamte Dissoziationsrate besitzt der Inhibitor eine langsame Bindungskinetik, so dass die Halbwertszeit für die Dissoziation auf 23 h kalkuliert wird [93]. Somit stellt BIRB 796 mit seiner sehr langsamen Dissoziationsrate einen der potentesten Inhibitoren für die p38 MAPK dar.

### **3.11 *In vitro* Testung der p38 MAPK Inhibitoren**

Zur Austestung der Inhibitoraktivitäten *in vitro* wurde eine etablierte Alveolar-makrophagen-Zelllinie (MH-S) genutzt [95]. Die Zellen wurden in MH-S Zellkulturmedium im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nachdem die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie mithilfe von Accutase aus ihrem Zellkulturgefäß abgelöst, in ein 50 ml Falcon überführt und 10 min. bei 125 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Je 200.000 Zellen wurden pro well in eine 48-well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bis zur Adhärenz kultiviert. Am nächsten Tag wurden alle wells 3 x mit HBSS gewaschen und stimuliert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von 10 µM bzw. 100 µM BIRB796 oder SB 203580 für 6 h im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen bzw. mit 10 ng/ml LPS stimulierte Zellen oder Zellen, die mit entsprechenden Konzentrationen Vehikel (DMSO) und LPS stimuliert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und 10 min. bei 2000 rpm, 4°C zentrifugiert, um Zellrückstände zu entfernen. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C eingefroren.

#### **3.11.1 p38 MAPK-Inhibitor-Applikation *in vivo***

Trauma/Hämorrhagie-Mäusen wurde direkt nach erfolgter Operation unmittelbar nach dem Aufwachen aus der Narkose der p38 MAPK Inhibitor BIRB 796 oral mittels einer Schlundsonde verabreicht. BIRB 796 [94, 96] wurde zuvor als Stammlösung (50 mg/ml) in DMSO gelöst und zur Applikation mit PEG 400 angereichert. Das Gewicht der T/H Mäuse wurde nach der Operation bestimmt

und der Inhibitor in einer Konzentration von 10 mg pro kg Körpergewicht in einem Volumen von 100 µl PEG 400 oral appliziert.

### **3.12 Apoptose/Nekrose Bestimmung**

Um die Apoptose- bzw. Nekroseraten von Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage von Trauma- bzw. T/H-Mäusen zu untersuchen, wurden diese Zellen in eine Mikrotiterplatte pipettiert (100.000 Zellen pro well) und mit 10 µl Ocatagam versetzt. Die Zellen wurden mit dem Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 FITC 20 min. bei 4°C inkubiert. Es folgten 2 Waschschriffe mit FACS-Puffer, danach wurden die Zellen in 100 µl Annexin Binding Buffer aufgenommen und in ein Polypropylenröhrchen überführt, indem bereits Allophycocyanin (APC) -markiertes Annexin V für die Bestimmung der Apoptose und Propidiumiodid für die Bestimmung der Nekrose vorgelegt wurden. Es folgte die Inkubation im Dunkeln für 15 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden nochmals 100 µl des Annexin Binding Buffers hinzu pipettiert und die Makrophagen bezüglich ihrer FSC/SSC Eigenschaften und nach ihrer F4/80 FITC-Markierung im FACS ge-gated und der prozentuale Anteil der Alveolarmakrophagen, welche apoptotisch bzw. nekrotisch waren, analysiert.

### **3.13 ELISA**

Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen von TNF-a, IL-6, MIP-2, KC, IL-1 Ra und IL-10 sowie HMGB1 in der bronchoalveolären Lavage von Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA Kits nach Herstellerangaben quantifiziert.

### 3.14 Zusammenfassung des experimentellen Versuchsablaufs im T/H-Modell mit konsekutiver Pneumonie

Nach Trauma- bzw. T/H-Induktion wurden die Lungen der entsprechenden Mäuse im Western Blot auf p38 MAPK Aktivität untersucht, unterschiedliche Serumparameter für mögliche Organfunktionsstörungen bestimmt, Zytokine und Chemokine in der BAL analysiert und Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen, sowie Blutleukozyten bestimmt. Sechs Stunden, 12 h oder 24 h nach der Operation wurden die Mäuse mit *S. pneumoniae* infiziert und die Keimlasten in den Lungen dieser Mäuse 24 h – 96 h später analysiert. Zusätzlich wurde das Überleben der jeweiligen Mäuse nach Infektion analysiert und der Gewichtsverlust über die Zeit bestimmt. Für definierte Experimente wurden T/H-Mäuse mit dem p38 MAPK Inhibitor BIRB 796 direkt nach der Resubstitutionsphase oral behandelt und nachfolgend die Aktivität der p38 MAPK in den Lungen bestimmt sowie die Phagozytosekapazität residenter Alveolarmakrophagen analysiert. Zudem wurden die Keimlasten in den Lungen dieser Mäuse und die Mortalität nach Infektion mit *S. pneumoniae* bestimmt (Abb.5).

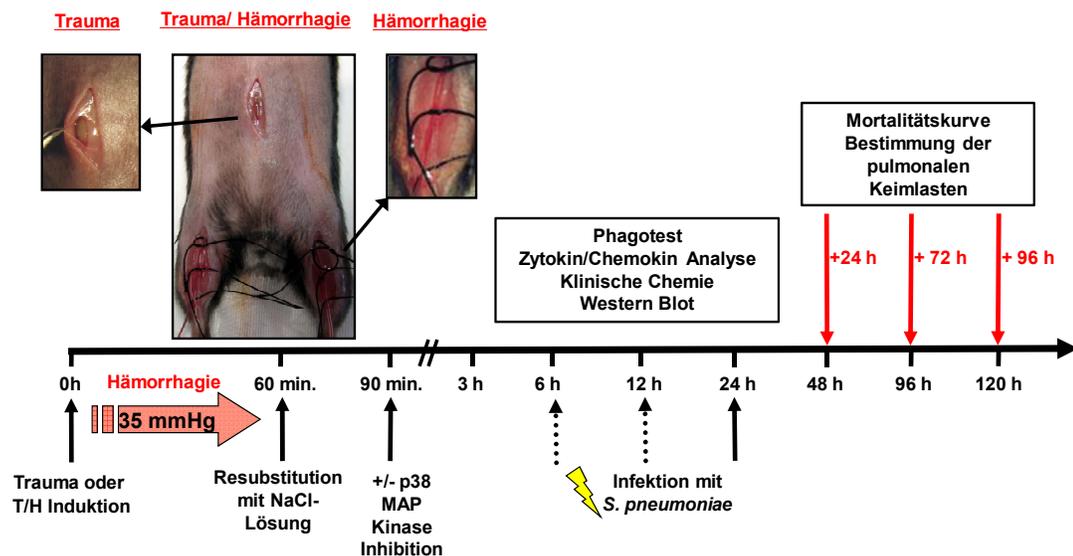


Abbildung 5: Zusammenfassung des Versuchsablaufs im T/H Mausmodell mit konsekutiver Pneumonie.

### **3.15 Statistik**

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen wurden mit einem Levene`s Test für die Gleichheit der Varianzen und dem Student`s t-test mittels SPSS für Windows ausgewertet. Die Mortalitätskurven wurden mit Hilfe des Log-rank Tests ausgewertet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den experimentelle Gruppen wurden bei  $p \leq 0,05$  angenommen.

## **4. Ergebnisse**

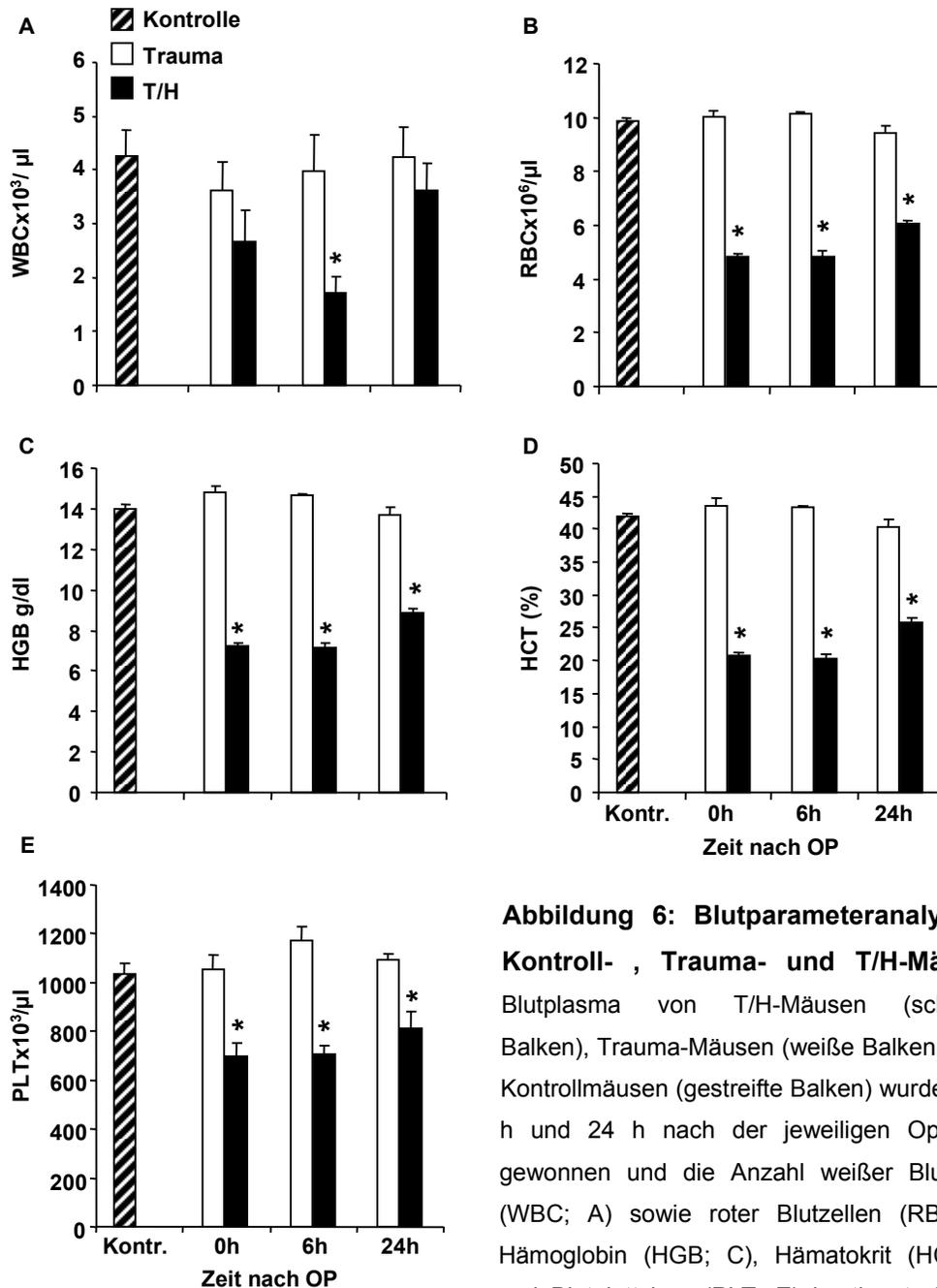
### **4.1 Charakterisierung des T/H Modells**

#### **4.1.1 Hämogramm von Kontroll-, Trauma- und T/H-Mäusen**

In initialen Untersuchungen wurde der Einfluss einer Trauma- bzw. T/H-Intervention auf Blutparameter von Trauma- bzw. Trauma/Hämorrhagie- und Kontrollmäusen analysiert. Es zeigten sich zu allen untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede im Blutbild von Trauma-Mäusen verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen (Abb. 6). Demgegenüber wiesen T/H-Mäuse signifikant verringerte weiße Blutzellen (WBC) besonders 6 h nach der Operation im Vergleich zu Trauma- und Kontrollmäusen auf (Abb. 6 A). Erythrozyten (red blood cells; RBC), Hämoglobin (HGB), Hämatokrit (HCT) und Blutplättchen (PLT) waren zu allen untersuchten Zeitpunkten im Blut von T/H-Mäusen signifikant verringert im Vergleich zu Kontroll- und Trauma-Mäusen (Abb.6 B-E). Diese Daten verdeutlichen die erfolgreiche Induktion einer Hämorrhagie in T/H Mäusen.

#### **4.1.2 Analyse klinisch-chemischer Parameter in Trauma- bzw. T/H-Mäusen**

Schwerer Blutverlust führt regelhaft zu einer Minderperfusion der inneren Organe, welche dadurch nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können. Hieraus entwickeln sich häufig Organdysfunktionen, die fatale Folgen haben können (multi-organ failure). Um zu untersuchen, ob Organschädigungen auch nach Trauma oder T/H in der Maus induziert werden, wurden Plasmaproben von Mäusen der entsprechenden experimentellen Gruppen einer klinisch-chemischen Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass Trauma allein keine Veränderung klinisch-chemischer Laborparameter induzierte (Abb.7), während T/H-Mäuse signifikant erhöhte GOT, GPT und LDH Werte im Vergleich zu Trauma- und Kontrolltieren 6 h nach Operation aufwiesen (Abb. 7 B-D). Diese erhöhten Werte weisen auf Organfunktionsstörungen insbesondere der Leber hin.



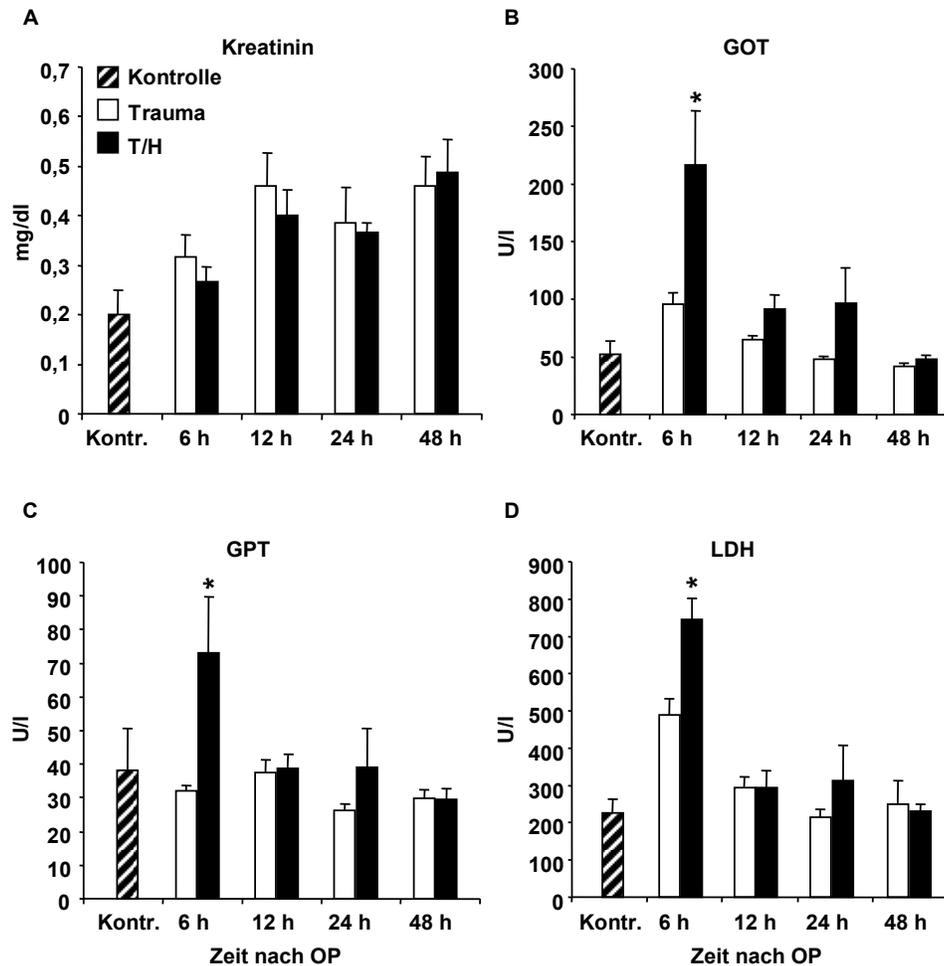
**Abbildung 6: Blutparameteranalyse in Kontroll-, Trauma- und T/H-Mäusen.**

Blutplasma von T/H-Mäusen (schwarze Balken), Trauma-Mäusen (weiße Balken) sowie Kontrollmäusen (gestreifte Balken) wurde 0 h, 6 h und 24 h nach der jeweiligen Operation gewonnen und die Anzahl weißer Blutzellen (WBC; A) sowie roter Blutzellen (RBC; B), Hämoglobin (HGB; C), Hämatokrit (HCT; D) und Blutplättchen (PLT; E) bestimmt. Gezeigt

werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 4 bis 6 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt; n = 12 für Kontrollmäuse); \*, p  $\leq$  0,05 verglichen mit Trauma-Mäusen.

Die Messung der Kreatinin-Werte als Ausdruck der renalen Funktion brachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen hervor (Abb.7 A). Bereits 12 h nach Operation konnten im Plasma der T/H-Mäuse die signifikant erhöhten GOT, GPT und LDH Werte nicht mehr nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die zuvor beobachteten Leberfunktio-

onsstörungen nur transienter Natur waren und sich bereits 12 h nach T/H-Induktion normalisiert hatten.

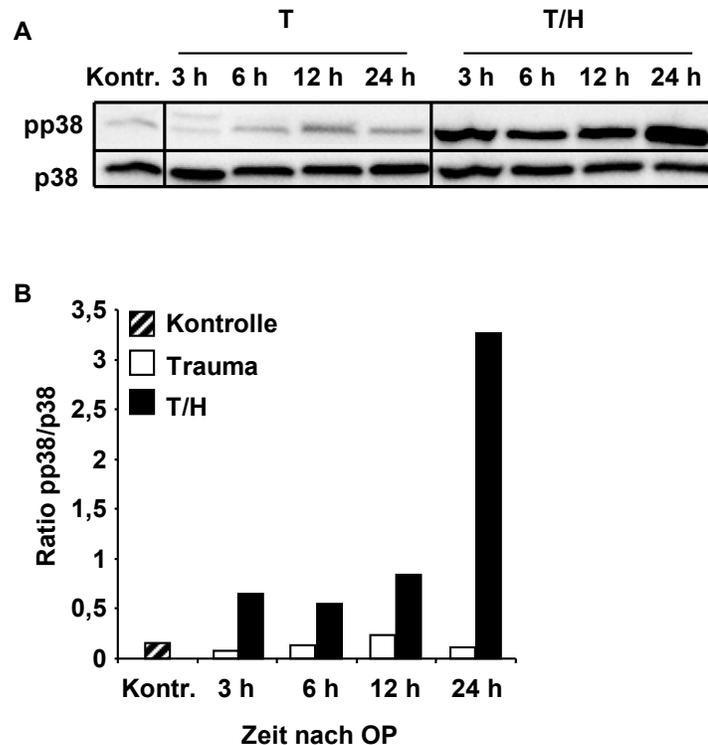


**Abbildung 7: Klinisch-chemische Laborparameter in Kontrollmäusen, Traumamäusen und T/H-Mäusen.** Automatisierte Analyse von Kreatinin (A), GOT (B), GPT (C) und LDH (D) in Blutplasmaproben von Kontrollmäusen 6 h nach inhalativer Desflurannarkose (gestreifte Balken) und 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Trauma (weiße Balken) oder T/H (schwarze Balken). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt (n = 4-8 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt). \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Trauma-Mäusen.

#### 4.1.3 Erhöhte p38 MAPK Aktivität in den Lungen von T/H-Mäusen

Als nächstes wurden die Aktivierungsmuster der p38 MAPK in den Lungen von Kontrollmäusen, Trauma und T/H Mäusen untersucht. Dafür wurden homogeni-

sierte Lungen von Mäusen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen per Western Blot analysiert (Abb.8 A-B).



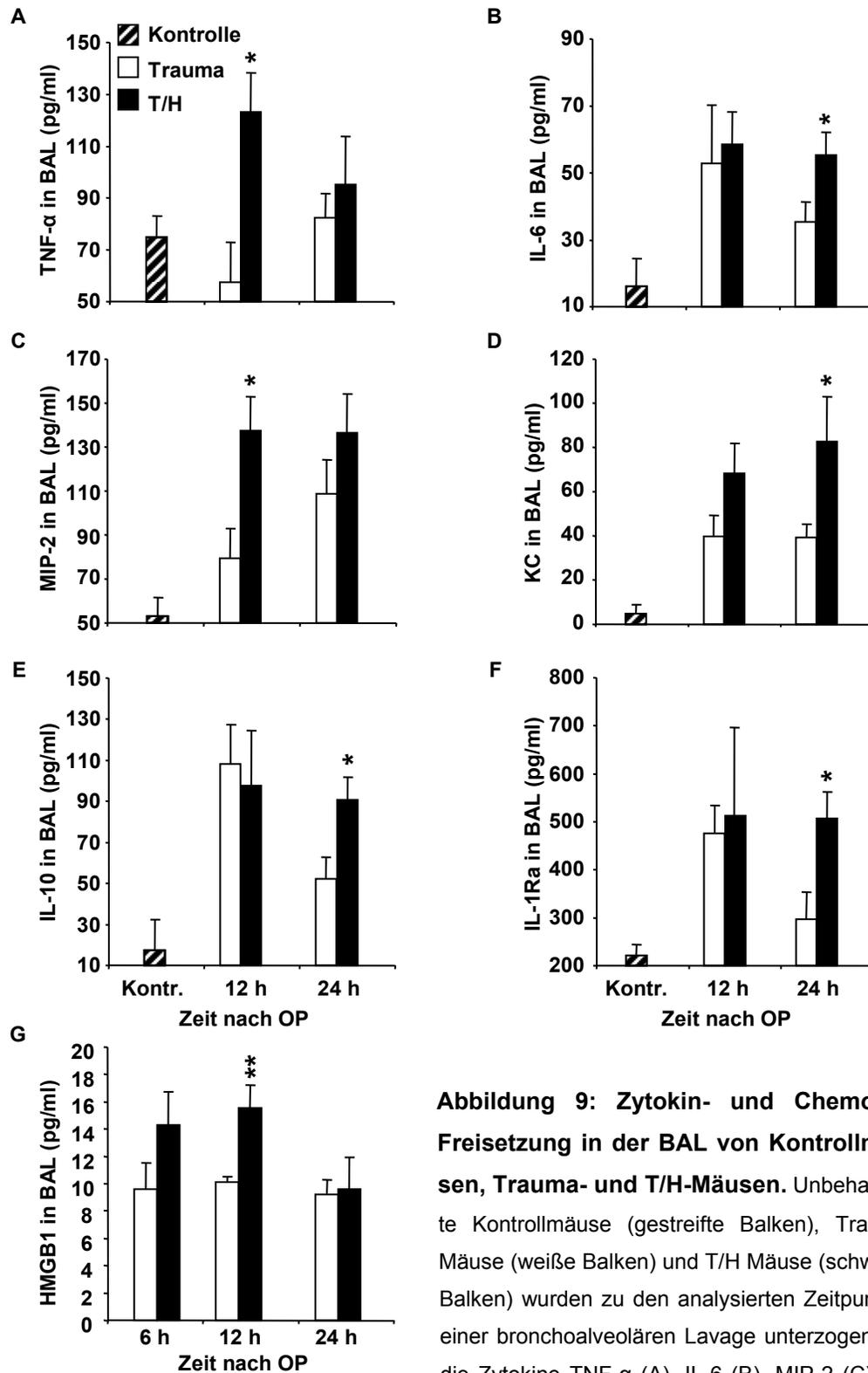
**Abbildung 8: Western Blot Analysen der p38 MAPK-Aktivierung in den Lungen von Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen.** Drei Stunden, 6 h, 12 h und 24 h nach Trauma- oder T/H-Operation wurden die Lungen der Mäuse entnommen und die Aktivität der p38 MAPK mittels Western Blot analysiert. Kontrollmäuse wurden 6 h nach inhalativer Desflurannarkose analysiert. Der gezeigte Western Blot (A) ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die p38 MAPK Phosphorylierung in den Lungen von Kontrollmäusen, Trauma- bzw. T/H-Mäusen wurde gegen p38 MAPK der jeweils entsprechenden Proben normalisiert. (B) Dargestellt wird der Phosphorylierungsgrad der p38 MAPK als pp38:p38 ratio nach Auswertung der Chemilumineszenzsignale mittels Bio1D Software.

Es ließ sich zeigen, dass es 3 h, 6 h und 24 h nach Operation zu keiner erkennbaren Aktivierung der p38 MAPK in den Lungen von Trauma-Mäusen ohne Hämorrhagie-Induktion im Vergleich zu Kontrollmäusen mit inhalativer Desflurannarkose kam. Trauma Mäuse zeigten allerdings zwölf Stunden nach Operation eine geringfügige Aktivierung der p38 MAPK verglichen mit Kontrollmäusen. Im Gegensatz hierzu zeigten T/H-Mäuse eine stark erhöhte Aktivierung der

p38 MAPK zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zu Kontroll- und Trauma-Mäusen (Abb. 8 A-B), wobei die stärkste Aktivierung der p38 MAPK in den Lungen der T/H-Mäuse 24 h nach Operation festgestellt werden konnte. Mithilfe densitometrischer Auswertung ließen sich die Unterschiede in der Aktivität der p38 MAPK zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen semi-quantitativ darstellen (Abb.8 B).

#### **4.1.4 Effekte von T/H auf die Zytokinfreisetzung im bronchoalveolären Kompartiment**

Da die p38 MAPK an der Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beteiligt ist, wurden diese Mediatoren in weiterführenden Untersuchungen in der bronchoalveolären Lavage von unbehandelten Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen analysiert. Es stellte sich heraus, dass alle gemessenen Zytokine in der BAL von Trauma-Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zu Kontrollmäusen leicht erhöht waren. In der Lavage von T/H-Mäusen konnten im Vergleich zu Trauma-Mäusen jedoch weiter erhöhte pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 nachgewiesen werden. Hierbei waren die TNF- $\alpha$  Zytokinspiegel in der BAL von T/H-Mäusen im Vergleich zu Trauma-Mäusen 12 h nach Operation und die IL-6 Spiegel 24 h nach Operation signifikant erhöht (Abb. 9 A, B). Die Chemokine MIP-2 und KC waren ebenfalls in der BAL von T/H-Mäusen im Vergleich zu Trauma-Mäusen erhöht, wobei die größten Unterschiede 12 h und 24 h nach Operation auftraten (Abb. 9 C, D). Auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-1Ra waren in der Lavage von T/H-Mäusen im Vergleich zu Trauma-Mäusen besonders 24 h nach Operation signifikant erhöht (Abb. 9 E, F). HMGB1, ein sogenanntes „danger-associated molecular pattern“ (DAMP) sowie pro-inflammatorischer Schlüsselmediator, welcher u.a. als Antwort auf Verletzung freigesetzt wird und die Aktivierung von MAPKs induziert, war ebenfalls in der BAL von T/H Mäusen 12 h nach Operation verglichen mit Trauma-Mäusen deutlich erhöht (Abb. 9 G). Insgesamt veranschaulichen diese Ergebnisse, dass es nach T/H-Induktion in Mäusen zu einer erhöhten Freisetzung von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Mediatoren in das bronchoalveoläre Kompartiment kommt.

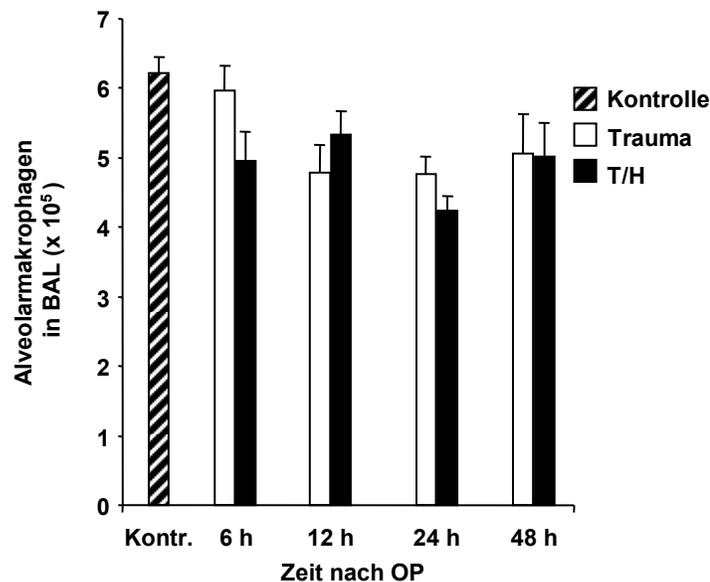


**Abbildung 9: Zytokin- und Chemokin-Freisetzung in der BAL von Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen.** Unbehandelte Kontrollmäuse (gestreifte Balken), Trauma-Mäuse (weiße Balken) und T/H Mäuse (schwarze Balken) wurden zu den analysierten Zeitpunkten einer bronchoalveolären Lavage unterzogen und die Zytokine TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), MIP-2 (C), KC

(D), IL-10 (E), IL-1Ra (F) und HMGB1 (G) mittels ELISA analysiert. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (n=4 für Kontrollmäuse und n=9-16 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt). \*, p  $\leq$  0,05 verglichen mit Trauma-Mäusen.

#### 4.1.5 Leukozytendifferenzierung in der BAL von Trauma- und T/H-Mäuse

Wie unter 4.1.4 beschrieben, zeigten T/H-Mäuse im Vergleich zu Kontroll- und Trauma-Mäusen erhöhte Zytokin- und Chemokinspiegel in ihrer BAL. Um zu analysieren, ob die beobachteten erhöhten Zytokinspiegel Einfluss auf die Mobilisierung von Leukozytenpopulationen in das bronchoalveoläre Kompartiment hatten, wurde die Verteilung der einzelnen Leukozytensubsets in der Lunge 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach der jeweiligen Operation charakterisiert. Es ließ sich zeigen, dass Trauma- oder T/H-Induktion keine pulmonale Leukozytenrekrutierung im Vergleich zu Kontrollmäusen induzierte. Es konnten ebenso keine Unterschiede in der Gesamtzahl residenter Alveolarmakrophagen in der BAL von Mäusen der verschiedenen Behandlungsgruppen nachgewiesen werden (Abb. 10).

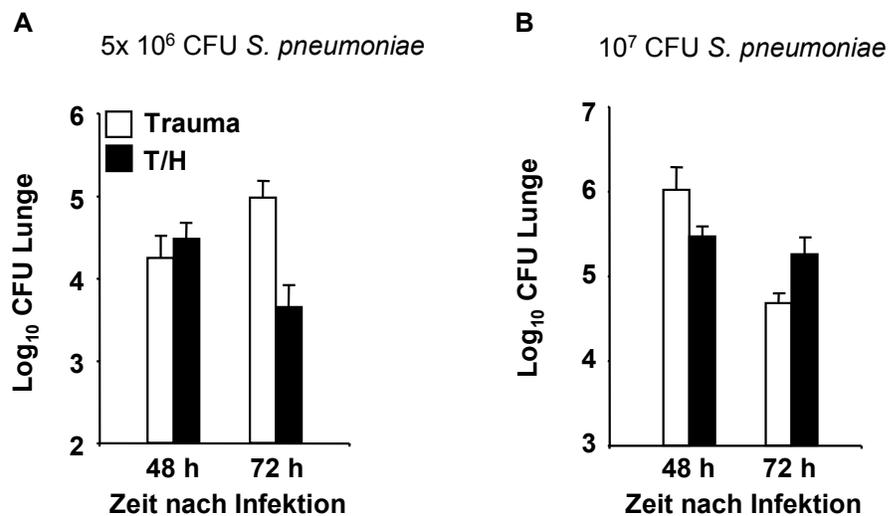


**Abbildung 10: Quantifizierung von Alveolarmakrophagen in der BAL von Trauma- und T/H-Mäusen** Unbehandelte Kontrollmäuse (gestreifte Balken), Trauma-Mäuse (weiße Balken) und T/H-Mäuse (schwarze Balken) wurden zu den analysierten Zeitpunkten einer bronchoalveolären Lavage unterzogen und mittels Pappenheim-gefärbten Zytozentrifugenpräparaten wurden die Zellzahlen der Alveolarmakrophagen bestimmt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. (n = 4 für Kontrollmäuse und n = 9-16 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt).

## 4.2 Charakterisierung der pulmonalen Infektabwehr von *Streptococcus pneumoniae* bei Trauma bzw. T/H

### 4.2.1 Vorversuche mit niedriger und mittlerer Infektionsdosis

In weiterführenden Experimenten wurde untersucht, ob T/H-Induktion negative Auswirkungen auf die protektive Immunität der Lunge gegenüber *Streptococcus pneumoniae* Infektionen hat. Hierfür wurden in Vorversuchen Trauma- und T/H-Mäuse 24 h nach Operation mit einer niedrigen ( $5 \times 10^6$  CFU) bzw. einer mittleren Dosis von  $1 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* infiziert und die Keimlasten in den Lungen 48 h und 72 h nach Infektion analysiert. Abbildung 11 A, B zeigt, dass T/H Mäuse nach Infektion mit  $5 \times 10^6$  CFU oder  $1 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* ähnliche Keimlasten in ihren Lungen aufwiesen wie Trauma-Mäuse nach entsprechender Infektion mit *S. pneumoniae*. Diese Daten zeigen, dass T/H-Mäuse auf low-dose challenge mit *S. pneumoniae* mit einer adäquaten Immunantwort reagieren können und unter diesen experimentellen Bedingungen keine Störung der pulmonalen Infektabwehr aufweisen.



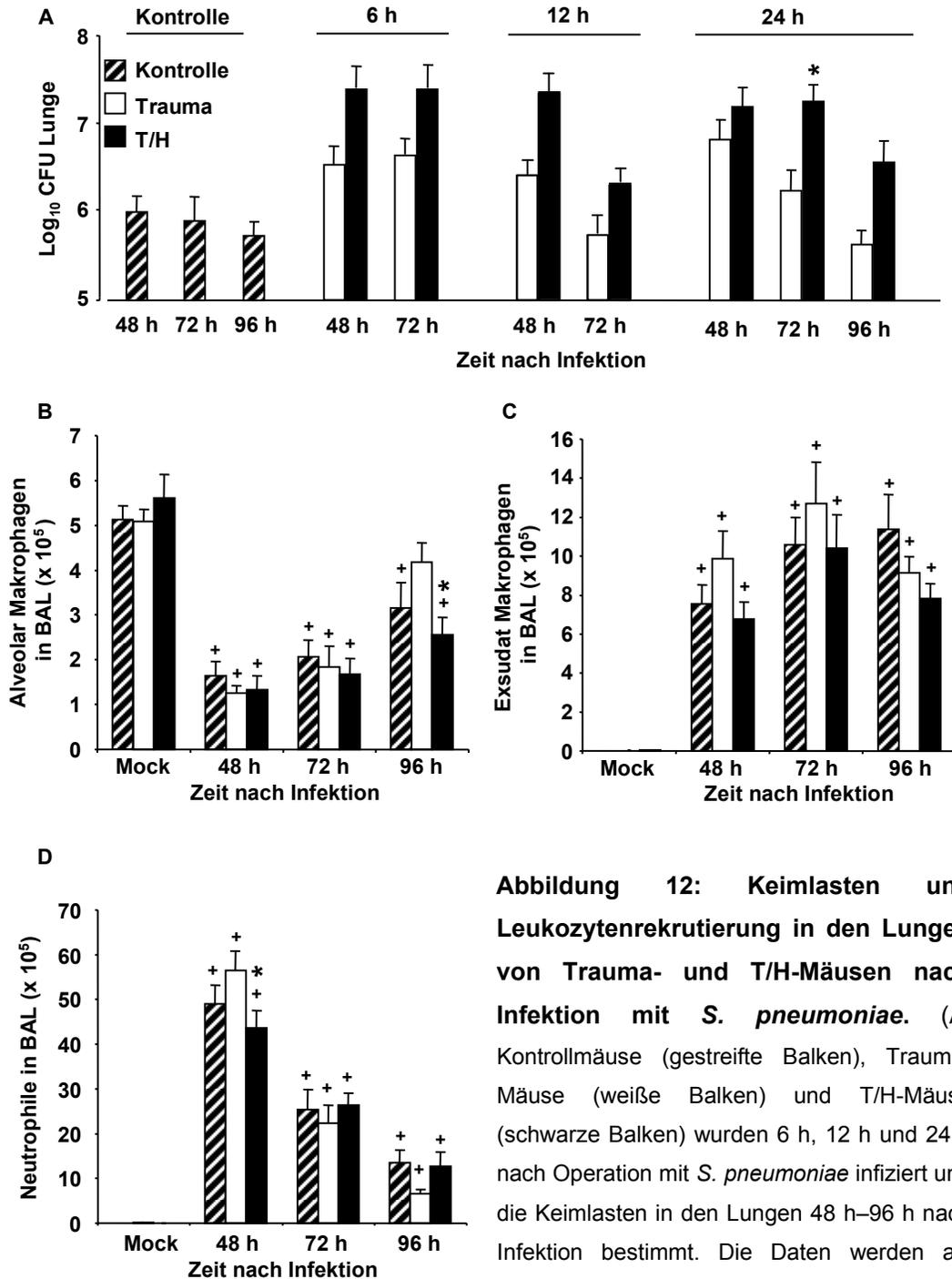
**Abbildung 11: Keimlasten in den Lungen von Trauma- und T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*.** Trauma-Mäuse (weiße Balken) und T/H Mäuse (schwarze Balken) wurden 24 h nach der jeweiligen Operation mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* infiziert. Die Keimlasten in den Lungen der Mäuse wurden 48 h und 72 h nach Infektion bestimmt. Die Versuchstiere wurden entweder mit  $5 \times 10^6$  (A) oder mit  $1 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* pro Maus (B) infiziert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n = 4 - 7 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt).

#### 4.2.2 Charakterisierung der pulmonalen Infektabwehr von Trauma- versus T/H-Mäusen bei schwerer Pneumonie

In weiterführenden Experimenten wurden Kontrollmäuse, Trauma- und T/H-Mäuse 6 h, 12 h oder 24 h nach Operation mit einer hohen Infektionsdosis von  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* pro Maus infiziert und die Keimlasten in den Lungen nach Infektion longitudinal analysiert (Abb. 12). Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigte sich, dass T/H-Mäuse eine erheblich attenuierte pulmonale Infektabwehr nach 48 h, 72 h und 96 h nach Infektion aufwiesen im Vergleich zu *S. pneumoniae*-infizierten Trauma-Mäusen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden insbesondere beim Infektionszeitpunkt 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU pro Maus beobachtet. Hier zeigten T/H-Mäuse besonders 72 h nach Infektion eine signifikant verschlechterte pulmonale Keimelimination verglichen mit Trauma Mäusen, welche mit der gleichen Infektionsdosis behandelt wurden (Abb. 12 A). Diese Daten zeigen auf, dass die T/H-Induktion in Mäusen eine post-traumatische Immunsuppression mit reduzierter pulmonaler Infektabwehrkapazität gegenüber hohen Keimlasten induziert.

Alveolarmakrophagen und Neutrophile spielen eine zentrale Rolle in der Phagozytose und Clearance inhalierter bakterieller Krankheitserreger [28]. Daher wurden in nachfolgenden Untersuchungen Leukozytenrekrutierungsmuster in Lavageflüssigkeiten von Trauma- und T/H-Mäusen, welche 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* pro Maus infiziert wurden, analysiert (Abb. 12 B-D). Es zeigte sich, dass sowohl Kontrollmäuse als auch Trauma- und T/H-Mäuse nach Infektion eine starke und signifikant verringerte Anzahl an Alveolarmakrophagen in ihren Lavageflüssigkeiten verglichen mit Mock-infizierten Kontrollmäusen aufwiesen. Dabei wurden die niedrigsten Zellzahlen 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* beobachtet, welche anschließend 96 h nach Infektion bereits wieder deutlich erhöht waren (Abb. 12 B). Auch die alveoläre Rekrutierung von Neutrophilen war in Mäusen aller Behandlungsgruppen 48 h nach Infektion am höchsten und sank zu den späteren Zeitpunkten wieder ab (Abb 12 D). Auch ließ sich zeigen, dass T/H-Mäuse im Vergleich zu Trauma-Mäusen eine leicht reduzierte Rekrutierung von Exsudatmakrophagen in das bronchoalveoläre Kompartiment zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion zeigten (Abb. 12 C). *S. pneumoniae*-infizierte T/H-Mäuse zeigten zudem 48

h nach Infektion eine signifikant reduzierte Neutrophilenakkumulation in der BAL im Vergleich zu *S. pneumoniae*-infizierten Trauma-Mäusen (Abb. 12 D).



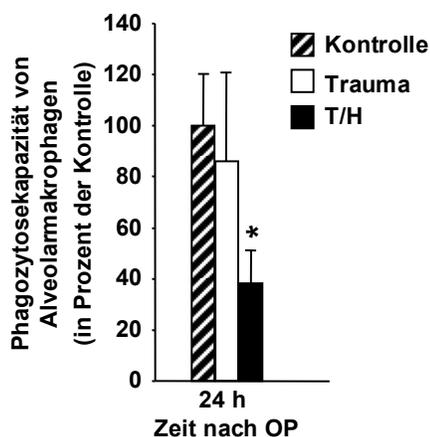
**Abbildung 12: Keimlasten und Leukozytenrekritung in den Lungen von Trauma- und T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*.** (A) Kontrollmäuse (gestreifte Balken), Trauma-Mäuse (weiße Balken) und T/H-Mäuse (schwarze Balken) wurden 6 h, 12 h und 24 h nach Operation mit *S. pneumoniae* infiziert und die Keimlasten in den Lungen 48 h–96 h nach Infektion bestimmt. Die Daten werden als Mittelwerte ± SEM angegeben. (n = 4-9 Mäuse pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt für die Infektionszeitpunkte 6 h und 12 h nach Operation. n = 6-12 für Kontrollmäuse; n = 18-24 für Trauma-Mäuse und n = 14-19 für T/H-Mäuse für den

pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt für die Infektionszeitpunkte 6 h und 12 h nach Operation. n = 6-12 für Kontrollmäuse; n = 18-24 für Trauma-Mäuse und n = 14-19 für T/H-Mäuse für den

Infektionszeitpunkt 24 h nach Operation. \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Trauma-Mäusen. (B-D) BAL Leukozyten-Differenzierung: (B) Alveolarmakrophagen, (C) Exsudatmakrophagen und (D) Neutrophile von Kontrollmäusen (gestreifte Balken), Trauma-Mäusen (weiße Balken) und T/H Mäusen (schwarze Balken), infiziert mit *S. pneumoniae* ( $1,5 \times 10^7$  CFU/Maus) 24 h nach der jeweiligen Operation. Mock-infizierte Mäuse erhielten THB. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben mit  $n = 10-16$  pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt und  $n = 3-4$  für Mock-infizierte Tiere. \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Trauma-Mäusen und +,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Mock-infizierten Mäusen.

#### 4.2.3 Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen und peripherer Blutmonozyten und -granulozyten

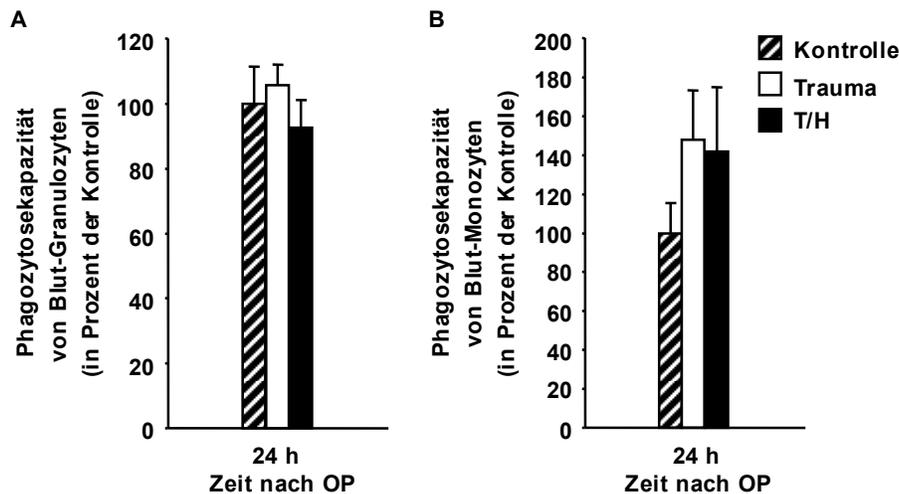
Die beobachteten Defizite in der Keimelimination in den Lungen von T/H-Mäusen, welche nicht durch eine veränderte Leukozytenrekrutierung *per se* hervorgerufen wurden, warfen die Frage auf, ob möglicherweise Effektorzellfunktionen residenter Alveolarmakrophagen in T/H Mäusen attenuiert waren. Daher wurden Alveolarmakrophagen aus Lungen von Kontrollmäusen, Trauma-Mäusen und T/H-Mäusen 24 h nach Operation mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen und ihre Phagozytosekapazität von FITC-markierten *E. coli* mittels Phagotest<sup>TM</sup> Assays analysiert. Es zeigte sich, dass die Phagozytosekapazitäten von Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen 24 h nach Operation im Vergleich zu Kontrollmäusen um ca. 38 % signifikant verringert waren. Alveolarmakrophagen von Trauma-Mäusen wiesen im Gegensatz dazu keine gestörte Phagozytosekapazität von 86 % auf (Abb. 13).



**Abbildung 13: Phagozytosekapazitäten residenter Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen, Trauma-Mäusen und T/H-Mäusen**

Durchflußzytometrische Analyse der Phagozytosekapazität von Alveolarmakrophagen aus Kontrollmäusen (gestreifte Balken), Trauma-Mäusen (weiße Balken) und T/H-Mäusen (schwarze Balken) 24 h nach Operation. Kontrollmäuse wurden = 100 % gesetzt. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt ( $n = 5$  Mäuse pro Behandlungsgruppe). \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Kontrollmäusen.

Im Gegensatz zu der zuvor beobachteten attenuierten Phagozytosekapazität residenter Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen zeigten periphere Blutmonozyten und -granulozyten von Trauma- und T/H-Mäusen keine reduzierte Phagozytoseaktivität (Abb.14).

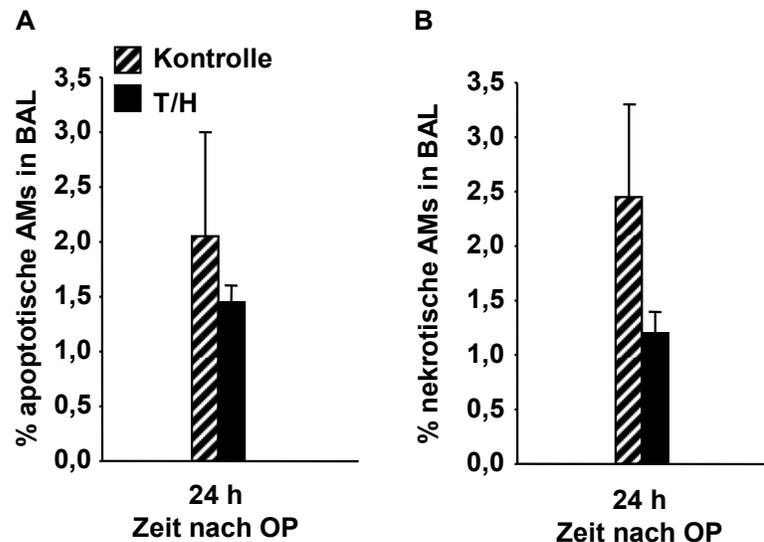


**Abbildung 14: Phagozytosekapazitäten von Granulozyten und Monozyten aus dem peripheren Blut von Kontrollmäusen, Trauma-Mäusen und T/H-Mäusen.** Durchflußzytometrische Analyse der Phagozytosekapazität von Granulozyten (A) und Monozyten (B) aus Kontrollmäusen (gestreifte Balken), Trauma-Mäusen (weiße Balken) und T/H-Mäusen (schwarze Balken) 24 h nach Operation. Die Daten werden als Mittelwerte (Kontrollmäuse = 100 %)  $\pm$  SEM dargestellt (n = 5 Mäuse pro Behandlungsgruppe).

#### 4.2.4 Analyse von Apoptose/Nekrose-Induktion residenter Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen

Um auszuschließen, dass die zuvor beobachtete verringerte Phagozytosekapazität residenter Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen durch erhöhte Apoptose- oder Nekrose-Induktion in der Makrophagenpopulation von T/H-Mäusen bedingt war, wurden Alveolarmakrophagen per Durchflußzytometrie auf Apoptose/Nekrose-Marker analysiert. Dafür wurden residente Alveolarmakrophagen von Kontrollmäusen und T/H-Mäusen mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen und mit APC-markierten Annexin V und Propidiumjodid gefärbt. Wie Abb. 15 zeigt, konnte keine erhöhte Apoptose- oder Nekrose-Induktion in Alveolar-

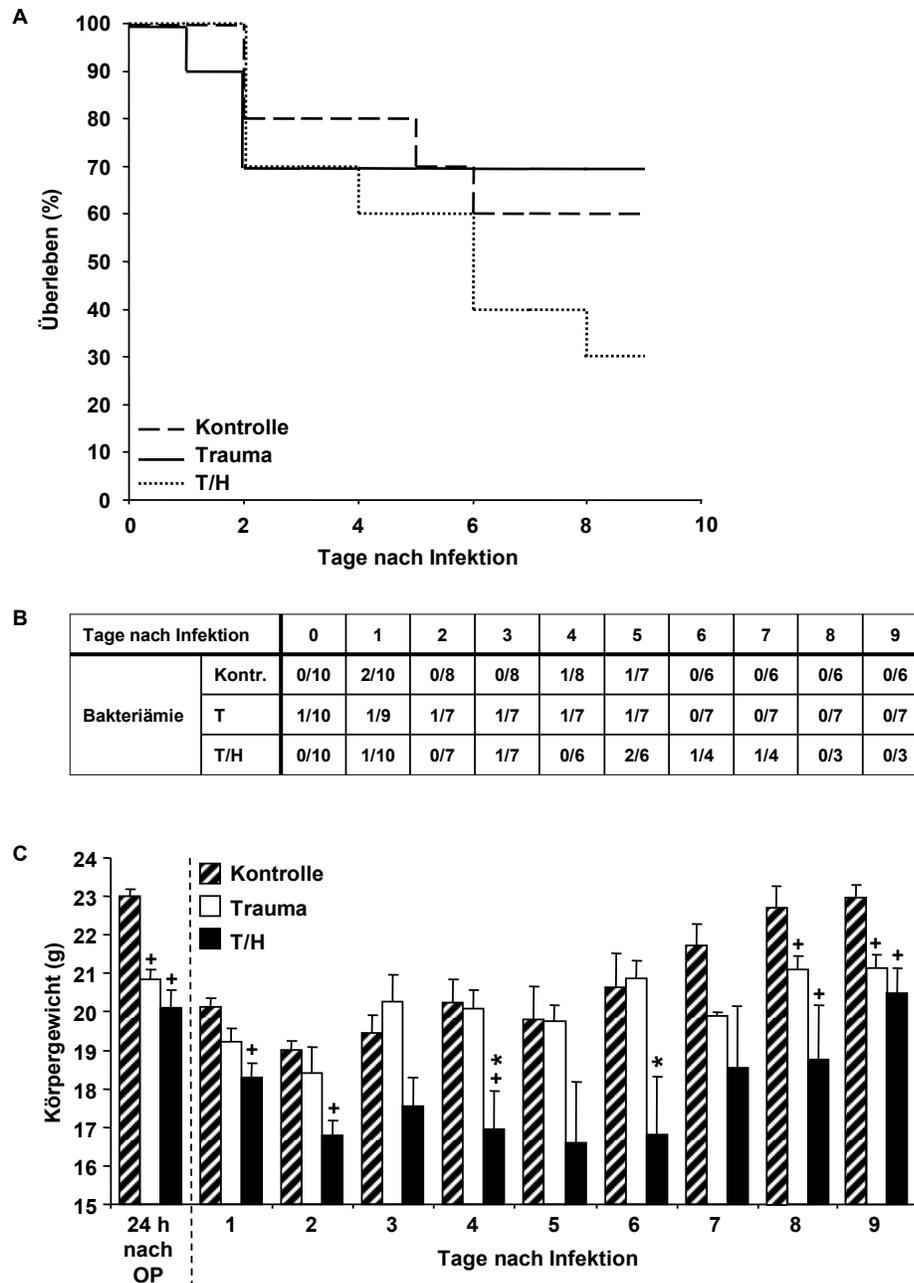
makrophagen von T/H Mäusen 24 h nach Operation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen festgestellt werden.



**Abbildung 15: Apoptose und Nekrose in Alveolarmakrophagen nach T/H-Induktion.** Alveolarmakrophagen (AM) aus der bronchoalveolären Lavage von Kontrollmäusen (gestreifte Balken) und T/H-Mäusen (schwarze Balken) 24 h nach Operation wurden mittels Durchflußzytometrie auf Apoptose- (A) oder Nekrose-Induktion (B) getestet. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. (n = 4 für T/H-Mäuse und n = 3 für Kontrollmäuse).

#### 4.2.5 Überleben von Trauma- und T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Um den Effekt der zuvor beobachteten, reduzierten protektiven Immunität von T/H Mäusen nach Pneumokokken-Infektion hinsichtlich Überleben einer schweren Pneumonie zu evaluieren, wurden Kontrollmäuse, Trauma-Mäuse und T/H-Mäuse 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU/Maus *S. pneumoniae* infiziert und einer Survival Analyse über 9 Tage unterworfen. Es ließ sich zeigen, dass T/H-Mäuse ein erheblich reduziertes Überleben im Vergleich zu infizierten Kontroll- oder Trauma-Mäusen aufwiesen. Nur 30 % der T/H-Mäuse überlebten Tag 9 nach Infektion, wobei in der Gruppe der Trauma Mäuse 70 % überlebten (Abb. 16 A).



**Abbildung 16: Überleben von Kontrollmäusen, Trauma- und T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae***

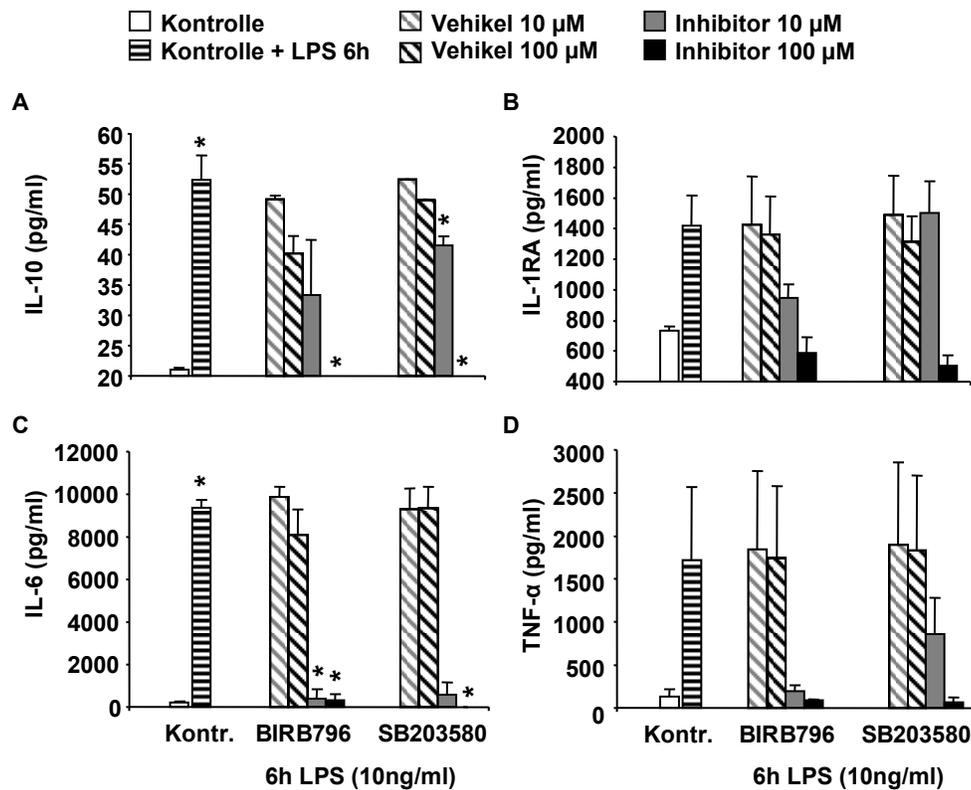
(A) Kontrollmäuse (gestrichelte Linie), Trauma-Mäuse (schwarze Linie) und T/H-Mäuse (gepunktete Linie) wurden 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* infiziert und die Überlebensrate dieser Mäuse für 9 Tage beobachtet. (B) Anzahl der lebenden bakteriämischen Mäuse der jeweiligen Behandlungsgruppen. (C) Bestimmung des Körpergewichts von Kontroll-, Trauma- und T/H Mäusen ab 24 h nach Operation bis Tag 9 nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Die Daten in (C) werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Für alle Behandlungsgruppen gilt  $n = 10$ . \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Trauma-Mäusen; +,  $p \leq 0,05$  verglichen mit Kontrollmäusen.

Außerdem wurden vermehrt T/H-Mäuse im Vergleich zu Kontroll- oder Trauma-Mäusen bakteriämisch (Abb. 16 B). Die verschlechterte Immunabwehr der T/H Mäuse und die erhöhte Mortalität spiegelte sich auch im Gewichtsverlust der T/H Mäuse über die Zeit nach Infektion wider. T/H-Mäuse zeigten eine signifikant stärkere Gewichtsreduktion im Vergleich zu Trauma-Mäusen (Abb.16 C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass T/H-Induktion in Mäusen zu einer verminderten Immunabwehr gegenüber Infektionen mit *S. pneumoniae* führt, begleitet von einem signifikanten Gewichtsverlust und einer erhöhten aber nicht signifikanten Mortalität relativ zu Kontroll- und Trauma-Mäusen.

### ***4.3 Auswirkungen der Inhibition der p38 MAPK auf die protektive Immunabwehr der Lunge in T/H-Mäusen***

#### **4.3.1 Austestung verschiedener p38 MAPK Inhibitoren *in vitro***

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die auftretende post-traumatische Immunsuppression in T/H-Mäusen einer erhöhten p38 MAPK-Aktivität begleitet wurde, sollten nun in den folgenden Versuchen die Effekte der p38 MAPK Inhibition auf die Immunabwehr nach T/H untersucht werden. In einem Vorversuch wurde die Effektivität zweier p38 MAPK Inhibitoren *in vitro* via Inhibition der Zytokinfreisetzung von MHS-Zellen nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml LPS) in zwei verschiedenen Konzentrationen (10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) evaluiert. Es ließ sich zeigen, dass Vehikel behandelte Zellen nach LPS Stimulation keine veränderte Zytokinfreisetzung im Vergleich zur LPS stimulierten Kontrolle aufwiesen. Demgegenüber zeigten beide Inhibitoren deutlich inhibitorische Effekte auf die Freisetzung der analysierten Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-1Ra. Es zeigte sich, dass BIRB796 in geringen Konzentrationen (10  $\mu$ M) die Zytokinfreisetzung von MHS-Zellen nach LPS-Stimulation stärker als SB203580 hemmte (Abb. 17). Aufgrund dieser Daten wurde BIRB 796 in allen weiterführenden Experimenten verwendet.



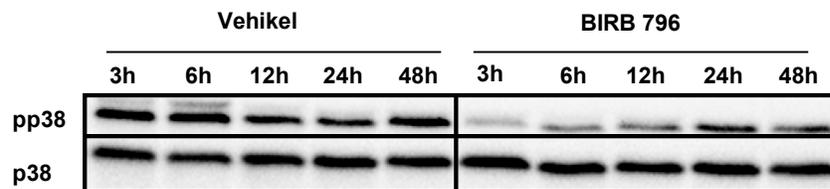
**Abbildung 17: BIRB796 hemmt die Zytokinfreisetzung von MHS-Zellen nach Stimulation mit LPS effektiver als SB203580**

MHS Zellen wurden für 6 h in Anwesenheit von BIRB 796 oder SB203580 (10 µM oder 100 µM) bzw. Vehikel mit 10 ng/ml LPS stimuliert und die Freisetzung von IL-10 (A), IL-1Ra (B), IL-6 (C) und TNF-α (D) im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. \*,  $p \leq 0,05$  verglichen mit LPS-stimulierter Kontrolle. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

#### 4.3.2 Pharmakologische Inhibition der p38 MAPK Aktivität in den Lungen von Trauma und T/H-Mäusen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Defekte der pulmonalen Immunabwehr in T/H-Mäusen assoziiert war mit einer erhöhten p38 MAPK-Aktivität im Lungenparenchym dieser Mäuse. Daher sollte in den nächsten Versuchen analysiert werden, ob die Inhibition dieser gesteigerten p38 MAPK-Aktivität zu einer verbesserten antibakteriellen Abwehr der Lunge gegenüber *S. pneumoniae* führt. Zu diesem Zweck wurde Mäusen unmittelbar

nach T/H- Induktion BIRB 796 (10 mg/kg) oder das entsprechende Vehikel (PEG/DMSO) über eine intragastrale Sonde appliziert und nachfolgend die Aktivität der p38 MAPK im Lungenparenchym mittels Western Blot Analysen bestimmt. Wie erwartet zeigten T/H-Mäuse nach Vehikel-Applikation eine erhöhte pulmonale p38 MAPK Aktivität. Demgegenüber führte die Applikation des Inhibitors jedoch in den Lungen von T/H-Mäusen zu einer reduzierten Phosphorylierung der p38 MAPK, gleichbedeutend mit einer reduzierten p38 MAPK Aktivität nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Operation, verglichen mit Vehikel-behandelten T/H-Mäusen (Abb.18).

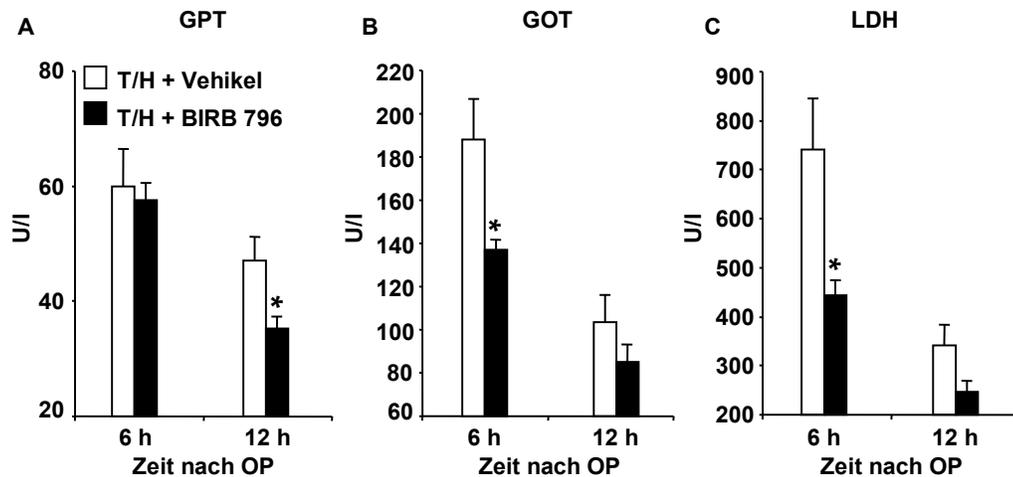


**Abbildung 18: p38 MAPK-Aktivität in den Lungen von T/H-Mäusen nach Inhibitor bzw. Vehikel Applikation.** T/H-Mäuse wurden mit p38 MAPK Inhibitor BIRB 796 bzw. Vehikel direkt nach Operation behandelt. Nach 3 h – 48 h nach T/H Induktion wurden die Lungen isoliert und im Western Blot auf p38 MAPK-Aktivität analysiert. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Der p38 MAPK-Antikörper diente der gleichmäßigen Beladungskontrolle.

#### 4.3.3 Effekte der p38 MAPK Inhibition auf Organfunktionsstörungen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den zuvor beschriebenen Organfunktionsstörungen und der Erhöhung der p38 MAPK Aktivität zu untersuchen, wurden T/H-Mäuse direkt nach der Resubstitutionsphase mit BIRB 796 behandelt und 6 h bzw. 12 h nach Operation wurden diverse klinisch-chemische Laborparameter im Plasma dieser Mäuse analysiert. Es zeigte sich, dass Inhibition der p38 MAPK nach 6 h post Operation zu einer deutlichen Verringerung der GOT und LDH Werte und 12 h später auch der GPT Werte im Plasma von T/H-Mäusen führte verglichen mit Vehikel-behandelten T/H-Mäusen (Abb. 19 A-C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die nach T/H-Induktion erhöhten Leberwerte als

Ausdruck einer beginnenden Organschädigung durch p38 Inhibition signifikant revertiert werden konnten.

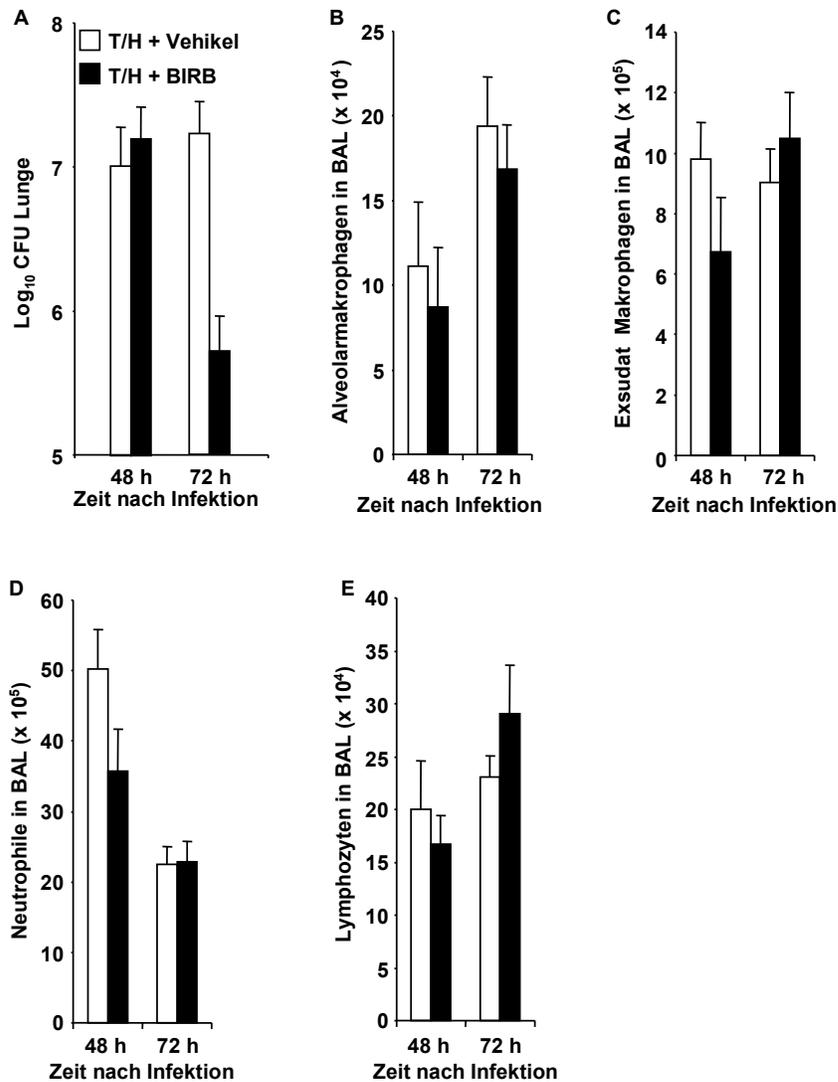


**Abbildung 19: Plasmaparameter von T/H-Mäusen nach Inhibitor oder Vehikel Applikation.** Automatisierte Analyse von GPT (A), GOT (B) und LDH (C) in Plasmaproben von Vehikel-behandelten T/H-Mäusen (weiße Balken) oder Inhibitor-behandelten T/H-Mäusen (schwarze Balken) 6 h und 12 h nach Operation. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. (n = 5-6 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt). \*,  $p \leq$  mind. 0,05 verglichen mit Vehikel-behandelten T/H-Mäusen.

#### 4.3.4 Inhibition der p38 MAPK führt zu einer verbesserten Infektabwehr der Lunge gegenüber *S. pneumoniae* Infektionen

Basierend auf den Beobachtungen, dass T/H zu einer dysregulierten Aktivierung der p38 MAPK führte und diese im Vergleich zu Trauma-Mäusen mit einer verschlechterten pulmonalen Erreger-Elimination einherging, konnte vermutet werden, dass die verstärkte Aktivierung der p38 MAPK an der verschlechterten Immunabwehr der Lunge gegenüber Pneumokokken-Infektionen beteiligt ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden T/H-Mäusen direkt nach der Resubstitutionsphase mit BIRB 796 bzw. Vehikel behandelt und diese Mäuse 24 h später mit  $1,5 \times 10^7$  CFU/Maus *S. pneumoniae* infiziert. Interessanterweise zeigten mit p38 MAPK Inhibitor behandelte T/H-Mäuse 72 h nach Infektion relativ zu

Vehikel-behandelten T/H Mäuse eine deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant, verringerte Keimlast in ihren Lungen (Abb. 20 A).

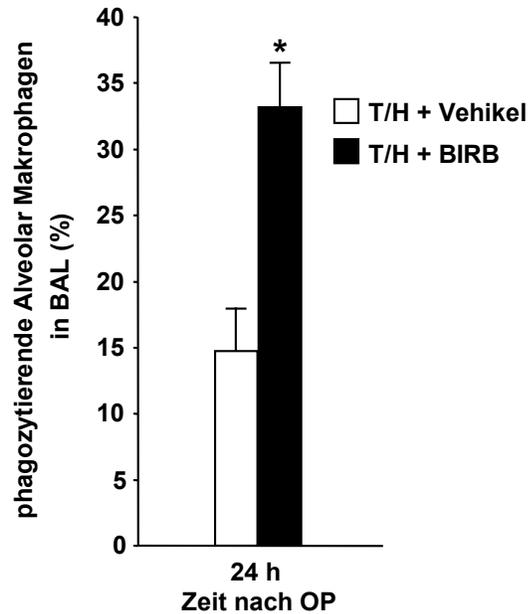


**Abbildung 20: Effekt der p38 MAPK Inhibition auf die pulmonale Keimabwehr von T/H-Mäusen.** (A) Keimlasten nach *S. pneumoniae* Infektion 24 h nach Operation in den Lungen von T/H-Mäusen, die entweder mit Vehikel (weiße Balken) oder mit BIRB796 (schwarze Balken) behandelt wurden. Keimlasten in den Lungen wurden 48 h und 72 h nach Infektion bestimmt. (B-E) BAL Leukozyten-Differenzierung: (B) Alveolarmakrophagen, (C) Exsudatmakrophagen, (D) Neutrophile und (E) Lymphozyten von Vehikel-behandelten (weiße Balken) bzw. Inhibitor-behandelten (schwarze Balken), 24 h nach Operation mit *S. pneumoniae* infizierten T/H-Mäusen (1,5x10<sup>7</sup> CFU/Maus). Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt (n = 11-16 Tiere pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt).

Diese Daten zeigen, dass die Inhibition der p38 MAPK nach T/H die pulmonale Erregerelimination deutlich verbessert. Gleichzeitig konnten aber keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl neu rekrutierter Leukozyten in den Alveolarraum der T/H-Mäuse im Vergleich zu Vehikel behandelten T/H-Mäusen nach Infektion festgestellt werden (Abb. 20 B-D). Diese Daten illustrieren, dass die Inhibition der p38 MAPK zu einer Wiederherstellung der protektiven Immunabwehr der Lunge von T/H-Mäusen beiträgt und somit die durch T/H induzierte posttraumatische Immunsuppression deutlich verringert.

#### **4.3.5 Inhibition der p38 MAPK verbessert die Phagozytosekapazität von Alveolarmakrophagen in T/H-Mäusen**

Um zu untersuchen, ob die zuvor in T/H-Mäusen beobachtete verbesserte Keimabwehr von *S. pneumoniae* nach p38 MAPK Inhibition mit einer verbesserten Phagozytoseaktivität residenter Alveolarmakrophagen von T/H Mäusen einherging, wurden Alveolarmakrophagen 24 h nach Operation aus T/H-Mäusen per BAL isoliert und ihre Phagozytosekapazität in An- oder Abwesenheit des p38 MAPK Inhibitors BIRB 796 (10  $\mu$ M) analysiert. Es zeigte sich, dass Inhibitor-behandelte Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen eine signifikant erhöhte Phagozytoseleistung von 33 % im Vergleich zu Vehikel (DMSO) -behandelten Alveolarmakrophagen (15 %) aufwiesen (Abb. 21). Diese in vitro Daten unterstützen die zuvor in vivo beobachtete, verbesserte pulmonale Infektabwehr von T/H Mäusen nach p38 MAPK Inhibition und untermauern den Schluss, dass eine anhaltend gesteigerte pulmonale p38 Aktivierung das Phagozytosepotential residenter professioneller Phagozyten gegenüber inhalierten pathogenen Erregern negativ beeinflusst .

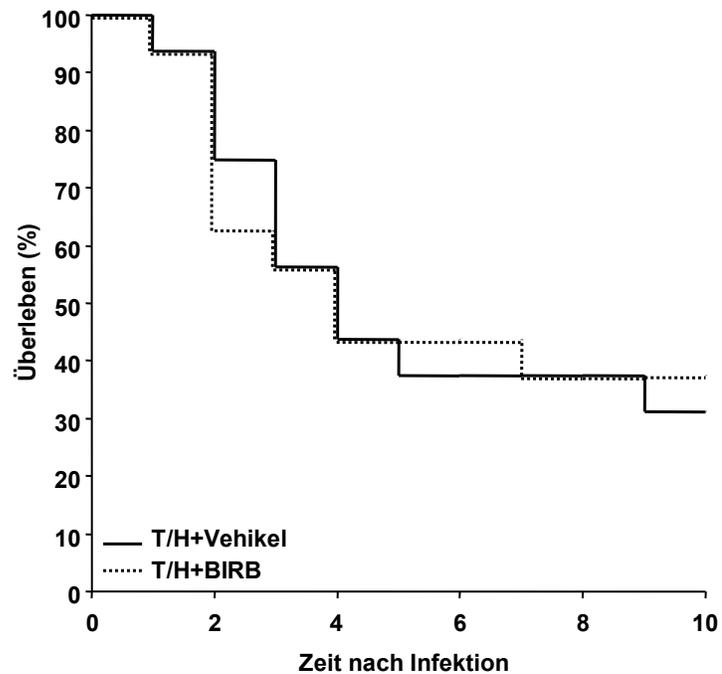


**Abbildung 21: p38 MAPK Inhibition verbessert die Phagozytosekapazitäten von Alveolarmakrophagen in T/H-Mäusen**

Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen wurden im Phagotest<sup>TM</sup> in Anwesenheit von BIRB796 (schwarze Balken) bzw. Vehikel (weiße Balken) auf ihre *E. coli* Phagozytosekapazität 24 h nach Operation getestet. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (n = 3 Tiere pro Behandlungsgruppe). \*, p  $\leq$  0,05 verglichen mit Vehikel-behandelten Alveolarmakrophagen.

#### **4.3.6 Effekt der p38 MAPK Inhibition auf das Überleben von *S. pneumoniae*-infizierten T/H-Mäusen**

Um nunmehr zu prüfen, ob die beobachteten positiven Effekte der p38 MAPK Inhibition auf die protektive Infektabwehr der Lunge in T/H-Mäusen auch zu einem verbesserten Überleben führte, wurden T/H-Mäuse direkt nach der Re-substitutionsphase mit BIRB 796 behandelt und 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* infiziert und einer Survival-Analyse über 10 Tage unterworfen. Wie in Abbildung 22 dargestellt, führte die Applikation des p38 MAPK Inhibitors zu keinem verbesserten Überleben der Inhibitor-behandelten T/H-Mäuse im Vergleich zu Vehikel-behandelten T/H-Mäusen mit schwerer Pneumonie.



**Abbildung 22: Überleben von T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* in An-bzw.-Abwesenheit von BIRB 796**

(A) T/H-Mäuse, die mit Vehikel (schwarze Linie) bzw. Inhibitor (gestrichelte Linie) behandelt wurden, wurden 24 h nach Operation mit  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* infiziert und die Überlebensrate dieser Mäuse für 10 Tage analysiert (n = 16 Mäuse pro Behandlungsgruppe).

## 5. Diskussion

### 5.1 Charakterisierung des T/H-Modells

Untersuchungen des Vollblutes von T/H-Mäusen zeigten signifikant reduzierte Leukozyten-, Thrombozyten- sowie Erythrozytenzahlen, sowie hierzu passend einen verringerten Hämatokrit-Wert zu allen untersuchten Zeitpunkten nach T/H-Induktion im Vergleich zu Trauma- und Kontroll-Mäusen. Diese Daten belegen eine erfolgreiche Hämorrhagie-Induktion in T/H-Mäusen. Weiterhin ließen sich in T/H-Mäusen signifikant erhöhte Serumparameter für GOT, GPT und LDH 6 Stunden nach Operation nachweisen. Die Pathophysiologie des Traumas in Kombination mit schwerem Blutverlust wurde bereits in früher publizierten Studien beschrieben [24, 26]. Auch in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten T/H-Modell entwickelten Mäuse 6 h nach Operation Organfunktionsstörungen, die jedoch nicht zu einem Multiorganversagen führten, sondern reversibel verliefen. Die exzessive Liberierung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Blut und in peripheren Organen (hyper- und hyposekretorische Krise) können zu schweren Organdysfunktionen bis hin zu MOF und Tod führen [38]. In vielen Studien wurde bereits von einer Dysbalance der Plasma-Zytokinspiegel nach Trauma berichtet. Exzessiv erhöhte Plasmaspiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 nach Trauma, schwerem Blutverlust oder Sepsis wurden sowohl in tierexperimentellen als auch in Patienten-Studien berichtet [4, 97, 98]. Begleitet wird diese pro-inflammatorische, hypersekretorische Zytokinantwort von einer kompensatorischen, anti-inflammatorisch dominierten Zytokinresponse mit dem Ziel, die Homöostase des Immunsystems wieder herzustellen. Diese kompensatorische Immunantwort, v.a. initiiert durch IL-10, kann zu einer Immunsuppression führen, welche ihrerseits die Antwort des Wirtes auf bakterielle Infektion attenuieren kann [99]. Sherry *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass erhöhte IL-10 Spiegel im Blutplasma von Polytraumapatienten das Risiko für eine Sepsis erhöhte [100]. Im vorliegend verwendeten T/H-Modell der Maus zeigten die Tiere eine Freisetzung von sowohl pro-inflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der bronchoalveolären Lavage

12 h - 24 h nach Operation. Trotz der hier gefundenen Erhöhung der CXC Chemokine KC und MIP-2 in der bronchoalveolären Lavage von T/H-Mäusen konnte keine veränderte Neutrophilen-Rekrutierung in die Lunge nach T/H-Induktion festgestellt werden. Ebenfalls in der BAL von T/H Mäusen stark erhöht war HMGB1, ein Mediator, welcher zur Familie der DAMPs gehört. HMGB1 wird aktiv von immunstimulierten Makrophagen freigesetzt [101]. Erhöhte Plasmaspiegel dieses Mediators wurden in Patienten mit hämorrhagischen Schock festgestellt, weshalb vermutet wird, dass HMGB1 am direkten Krankheitsverlauf nach Hämorrhagie bei Patienten und in tierexperimentellen Systemen beteiligt ist [102]. Beispielsweise bindet HMGB1 an den RAGE Rezeptor, welcher wiederum eine Signalkaskade zur p38 und NFκB Aktivierung induziert [103]. Diese Daten zeigen, dass das hier verwendete T/H Modell der Maus viele Parallelen zu den bei Polytraumapatienten beobachteten Mediatorprofilen aufweist und somit als präklinisches T/H-Modell Verwendung finden kann.

### **5.1.2 Beteiligung der p38 MAPK an der posttraumatischen Immunsuppression**

Die p38 MAPK ist an der Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen beteiligt [92, 104]. Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung einzelner Zytokin- und Chemokinspiegel in der bronchoalveolären Lavage wurde begleitet von einer markanten Erhöhung der p38 MAPK im Lungenparenchym nach T/H-Induktion, verglichen mit Kontroll- und Trauma-Mäusen. Nach kürzlich publizierten Arbeiten könnten MAPK Signalwege eine kritische Rolle in der beobachteten posttraumatischen Immunsuppression spielen [105, 106]. So regulieren MAPKs die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Alveolar-makrophagen in Rattenlungen nach hämorrhagischem Schock mit Sepsis [105]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der p38 MAPK eine adäquate TH1 Antwort in septischen Mäusen wiederherstellte und das Überleben der Versuchstiere deutlich verbesserte [69]. In einer weiteren Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch Hypoxie induzierte erhöhte Freisetzung von IL-6 in Kupffer-Zellen von Mäusen durch Inhibition der p38 MAPK *in vitro* inhibiert werden konnte [107]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zei-

gen, dass T/H-Induktion in Mäusen zu einer vermehrten Aktivierung der p38 MAPK in den Lungen zu allen untersuchten Zeitpunkten führte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der gesteigerten p38 MAPK Aktivität im vorliegenden T/H Modell der Maus potentiell eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer posttraumatischen Immunsuppression nach T/H-Induktion in der Maus zukommen kann.

## **5.2 Infektion bei posttraumatischer Immunsuppression**

Um die Auswirkungen der erhöhten MAPK-Aktivität in den Lungen von T/H-Mäusen auf die Immunabwehr zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente mit *Streptococcus pneumoniae* durchgeführt. Infektion von T/H-Mäusen mit geringen und mittleren Keimlasten von *S. pneumoniae* führte zu keiner attenuierten bakteriellen Erregerelimination in den Lungen dieser Mäuse verglichen mit *S. pneumoniae*-infizierten Trauma-Mäusen. Diese Daten weisen darauf hin, dass das Immunsystem von T/H-Mäusen keiner vollständigen Immunparalyse unterliegt, sondern geringe und mittlere Keimlasten abwehren kann. Die Infektion von T/H-Mäusen mit  $1,5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* pro Maus führte jedoch zu einer signifikant verschlechterten Keimabwehr in den Lungen von T/H-Mäusen verglichen mit Trauma- und Kontroll-Mäusen, insbesondere drei Tage nach Infektion. Dabei erwies sich der Infektionszeitpunkt 24 h nach T/H-Induktion am fatalsten für diese Mäuse. Zeitgleich zeigten *S. pneumoniae* infizierte T/H-Mäuse eine stark erhöhte Mortalität verglichen mit Trauma- und Kontroll-Mäusen. Diese erhöhte Mortalitätsrate wurde begleitet von einer starken Gewichtsreduktion der T/H-Mäuse nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu Kontroll- und Trauma-Mäusen. Diese Versuche belegen eine reduzierte Immunabwehr der Lunge gegenüber *S. pneumoniae* Infektionen nach T/H-Induktion, wohingegen Trauma alleine zu keiner verschlechterten Infektabwehr gegenüber *S. pneumoniae* Infektionen führte. Es ließen sich allerdings keine wesentlichen Unterschiede in der pulmonalen Leukozytenrekrutierung von T/H-Mäusen im Vergleich zu Trauma- und Kontrollmäusen nachweisen. Insgesamt lässt sich aus diesen Daten schließen, dass die mit der T/H Induktion einhergehende Immunparalyse ursächlich nicht durch veränderte Leukozytenrekrutie-

rung, sondern eher durch veränderte Effektorzellfunktionen begründet ist, welche die beobachtete, verringerte pulmonale Bakterienelimination in T/H-Mäusen erklären. Veränderungen der Immunabwehr nach Polytrauma oder schweren Operationen sind ein gravierendes, intensivmedizinisches Problem [89, 108-112], aber es gibt nur wenige Studien über pathophysiologische Veränderungen in der dynamischen Wirt-Pathogen Interaktion der Lunge nach Trauma oder T/H-Induktion *in vivo*. So wurde kürzlich berichtet, dass Trauma-Induktion in Form eines einzelnen Laparotomie-Schnittes in Mäusen zu einer verschlechterten Immunabwehr der Lunge gegenüber *Staphylococcus aureus* Infektionen führen kann [113]. Manderscheid *et al.* zeigten ebenfalls eine verschlechterte Keimabwehr in Mäusen, die 24 h nach einem Laparotomieschnitt intranasal mit *E. coli* infiziert wurden. Zusätzlich zeigten diese Mäuse eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu nicht operierten Tieren [85]. In der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch im Widerspruch zu den zuvor genannten Studien Trauma-Mäuse nach Laparotomie keine signifikant verschlechterte pulmonale Keimabwehr nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu infizierten Kontrollmäusen. Die in früheren Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit berichteten unterschiedlichen Suszeptibilitäten von Trauma-Mäusen gegenüber bakteriellen Infektionen könnten auf Spezies-spezifische Unterschiede zurückzuführen sein, jedoch auch durch Abweichungen in den verwendeten Operationstechniken bzw. unterschiedliche Suszeptibilitäten der verwendeten Mausstämme gegenüber den verwendeten Erregern bedingt sein.

### **5.2.1 Verschlechterte Phagozytoseaktivität residenter Alveolar-makrophagen nach T/H-Induktion**

Residente Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen wiesen eine signifikant attenuierte Phagozytosekapazität im Vergleich zu Trauma- und Kontrollmäusen 24 h nach Operation auf. Diese beeinträchtigte Phagozytoseleistung spielt wahrscheinlich eine maßgebliche Rolle in der verschlechterten pulmonalen Immunabwehr von T/H-Mäusen gegenüber inhalierten bakteriellen Erregern. Einige Studien konnten zeigen, dass Operationen bzw. traumatische Ereignisse eine verminderte zellvermittelte Immunität aufgrund verminderter Antigen-

Präsentation durch Makrophagen induzieren, welches mit einer erhöhten Suszeptibilität für Infektionen einhergeht [89]. In einigen Studien wurde beschrieben, dass Trauma-Patienten eine verringerte Expression des humanen Leukozyten-Antigens (HLA-DR) auf Makrophagen aufweisen und dieses mit der Entwicklung einer Sepsis und schweren klinischen Verläufen korreliert [114-116]. In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir eine verringerte Phagozytosekapazität residenter Alveolarmakrophagen, welche nicht durch erhöhte Apoptose- oder Nekroseraten dieser Zellen erklärt werden konnte. Auch in anderen Studien wurden bereits verminderte Effektorzellfunktionen unterschiedlicher Zellpopulationen nach T/H berichtet [117, 118]. Es ist möglich, dass die hier beobachtete attenuierte Phagozytoseleistung von AM durch die beobachteten, erhöhten IL-10 Spiegel im bronchoalveolären Kompartiment der T/H Mäuse verursacht wurde [54]. IL-10 verringert die Phagozytosefunktion von Alveolarmakrophagen und korreliert mit einer verschlechterten Erregerelimination in Trauma-Patienten [88].

### ***5.3 Effekt der Inhibition der p38 MAPK auf die posttraumatische Immunsuppression***

Vorversuche zur Wirksamkeit der verwendeten p38 MAPK Inhibitoren zeigten, dass der p38 MAPK Inhibitor SB203580 weniger effektiv als der Diaryl-Urea Inhibitor BIRB 796 war. Die Applikation des p38 MAPK Inhibitors BIRB 796 direkt nach Operation führte zu einer verbesserten Keimabwehr in den Lungen von T/H-Mäusen verglichen mit Vehikel behandelten T/H-Mäusen. Daraus lässt sich eine Beteiligung der p38 MAPK an der posttraumatischen Immunsuppression im Infektionsmodell mit *S. pneumoniae* ableiten. Obwohl die Unterschiede in den Lungen-Keimlasten von Inhibitor behandelten T/H-Mäusen verglichen mit Vehikel behandelten T/H-Mäusen nicht statistisch signifikant waren, lässt sich ein deutlicher Trend zur verbesserten Keimelimination in den Lungen von T/H-Mäusen nach Inhibitorapplikation erkennen. Das die beobachteten Unterschiede in den Keimlasten kein Signifikanzniveau erreichten, mag auch an den experimentellen Begleitumständen liegen, da die aufwändigen und langwierigen operativen Eingriffe an der Maus nur erlaubten, einige wenige T/H-Mäuse pro

Tag (n=3-4/Tag) für nachfolgende Infektionsexperimente mit *S. pneumoniae* vorzubereiten. Hieraus ergab sich, dass an aufeinander folgenden Tagen jeweils generierte T/H-Mäuse nie mit dem exakt gleichen Pneumokokken-stock infiziert werden konnten. Dennoch führte die Inhibition der p38 MAPK nicht nur zu einer verbesserten bakteriellen Clearance, sondern auch zu einer Normalisierung der Serumparameter GOT, GPT und LDH in T/H Mäusen, welches den Schluss zulässt, dass die Inhibition der p38 MAPK unmittelbar nach T/H auch organ-protective Effekte hat. In anderen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition der p38 MAPK das Überleben bei polymikrobieller Sepsis verbessert [69], wahrscheinlich aufgrund der Inhibition überschießender inflammatorischer Mediatorfreisetzung. So zeigten beispielsweise Thobe *et al*, dass die Freisetzung von IL-6 nach Hypoxie-Induktion an Kupffer-Zellen der Maus durch p38 MAPK und nicht ERK oder JNK MAPK Signalwege vermittelt wird [107]. Auch wenn kürzlich gezeigt werden konnte, dass eine frühe systemische Expression von TNF- $\alpha$  das Überleben nach T/H beim Menschen verbessert [119], können prinzipiell überschießende pro-inflammatorische Zytokinantworten von IL-6 und TNF- $\alpha$  nach Polytrauma oder schweren Operationen nachteilig für den Patienten sein [39, 41, 120]. Die hier aufgezeigte erhöhte Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen in den Lungen von T/H-Mäusen im Vergleich zu Trauma-Mäusen lassen jedoch gegenwärtig noch keinen endgültigen Aufschluss über ihre exakte Wirkung im T/H-Infektionsmodell zu, da Zytokine grundsätzlich pleiotrope Effekte haben. Auch die Redundanz im Zytokinnetzwerk macht es schwierig, einzelnen Zytokinen eine Beteiligung an post-traumatischen Immunparalysen beizumessen. So konnte in einer Untersuchung gezeigt werden, dass die Hemmung einzelner Mediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$  mit Antikörpern in einem Mausmodell des hämorrhagischen Schocks zu keiner verbesserten Überlebensrate führte [121], während in einer anderen Untersuchung die Inhibition von IL-10 nach hämorrhagischem Schock in der Ratte zwar zu einer reduzierten pro-inflammatorischen Zytokinresponse, jedoch zu keinem verbesserten Überleben dieser Tiere führte [122].

### **5.3.1 Inhibition der p38 MAPK verbessert Phagozytoseleistungen residenter Alveolarmakrophagen nach T/H-Induktion**

In der vorliegenden Arbeit führte die Inhibition der p38 MAPK zu einer signifikant verbesserten Phagozytosekapazität residenter Alveolarmakrophagen und somit zu einer verbesserten Effektorzellfunktion, welche zugleich die Immunabwehr gegenüber sekundären Infektionen nach T/H deutlich verbesserte. Der genaue Mechanismus des Effekts der p38 MAPK Inhibition auf die Phagozytoseleistung von Alveolarmakrophagen nach T/H ist jedoch bislang unklar und muss weiter untersucht werden. Hinzu kommt, dass die Inhibition der p38 MAPK zu keinem Überlebensvorteil von T/H-Mäusen mit schwerer Pneumonie im Vergleich zu Vehikel-behandelten T/H-Mäusen führte. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Inhibition der p38 MAPK einmalig innerhalb der ersten 24 h nach T/H-Operation. Ob und in wieweit eine repetitive Applikation des p38 MAPK-Inhibitors zu einem verbesserten Überleben *S. pneumoniae*-infizierter T/H-Mäuse führt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert. Es kann jedoch spekuliert werden, dass die exzessive Inhibition der p38 MAPK gleichwohl zu einer anhaltenden Immunsuppression im Polytraumapatienten führen könnte, welches schwerwiegende Konsequenzen für den Patienten haben kann [123]. Jüngste Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass die Korrektur veränderter zellulärer Signaltransduktionswege zu frühen Zeitpunkten nach Trauma oder Sepsis zu einem verbesserten klinischen Verlauf in kritisch kranken Patienten führen könnte [70]. Diese Hypothese lässt sich jedoch auf Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten Daten nur partiell untermauern.

## 6. Zusammenfassung

Auch wenn Polytraumapatienten zunächst ihre schweren Verletzungen überleben, erleidet eine Vielzahl von Patienten eine Immunparalyse, welche sie anfällig für sekundäre Infektionen macht, die ihrerseits wiederum häufig zu septischen Verläufen und einer erhöhten Letalität führen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Two-Hit-Modell bestehend aus T/H-Induktion in der Maus mit anschließender Pneumokokkenpneumonie entwickelt, um die Einflüsse der p38 MAPK Signaltransduktionswege auf die Immunabwehr der Lunge nach T/H im tierexperimentellen Modell zu untersuchen. Dieses Modell erlaubt die Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen bei posttraumatischen Immunparalysen. Im Detail wurde geprüft, ob eine erhöhte MAPK Aktivität an einer posttraumatischen Immunparalyse nach T/H Induktion beteiligt ist und ob eine Hemmung dieser MAPK Aktivität zu einer verbesserten Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae* Infektionen führt. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass T/H-Mäuse im Vergleich zu Kontroll- und Trauma-Mäusen eine posttraumatische Immunsuppression erfahren, die sich durch eine verschlechterte pulmonale Bakterienelimination und erhöhter Mortalität nach Infektion mit *S. pneumoniae* äußert. Diese attenuierte Keimabwehr wurde begleitet von einer stark erhöhten pulmonalen p38 MAPK Aktivität sowie erhöhten pro- und antiinflammatorischen Zytokinspiegeln in der bronchoalveolären Lavage dieser Mäuse. Alveolarmakrophagen von T/H Mäusen wiesen eine verringerte Phagozytosekapazität im Vergleich zu Alveolarmakrophagen von Trauma- und Kontroll-Mäusen auf. Inhibition der p38 MAPK verbesserte die Keimelimination in den Lungen von T/H-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Zusätzlich bewirkte die Inhibition der p38 MAPK Signalkaskade eine verbesserte Phagozytoseleistung residenter Alveolarmakrophagen von T/H-Mäusen. Da die Inhibition der p38 MAPK zu keiner verbesserten Überlebensrate von T/H-Mäusen nach *S. pneumoniae* Infektion führte, scheint eine therapeutische Inhibition der p38 MAPK zur Verbesserung der pulmonalen protektiven Immunität bei T/H Patienten zumindest zum gegenwärtigen Erkenntnisstand nur eine limitierte klinische Relevanz zu haben.

## 7. Ausblick

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Inhibitor BIRB 796 hemmt hauptsächlich die p38  $\alpha$  und  $\beta$  Isoformen des MAPK Komplexes. Daher sollten in weiterführenden Untersuchungen mithilfe von definierten p38 MAPK Knock-out Mäusen Isoform-spezifische Beteiligungen der p38 MAPK an der posttraumatischen Immunsuppression evaluiert werden. Zukünftige Untersuchungen sollten auch die Beteiligung weiterer Signaltransduktionswege, wie beispielsweise der MAPKs ERK und JNK an der posttraumatischen Immunsuppression evaluieren, möglicherweise mit spezifischen Inhibitoren für diese Signaltransduktionswege oder entsprechenden Knock-out Mäusen. Mit dieser Arbeit konnte ein zukünftiger Angriffspunkt für die Therapie der posttraumatischen Immunparalyse aufgezeigt werden. Die Inhibition einzelner MAPKs könnte folglich einen denkbaren Ansatz darstellen, um post-traumatische Immunsuppressionen in der Klinik zu verhindern und somit Polytraumapatienten vor Infektionen mit opportunistischen Krankheitserregern zu schützen.

## 8. Material

### 8.1 Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm™ ECL plus	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Brutschrank Function line	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)
Bunsenbrenner Fireboy eco	Integra Biosciences (Chur, CH)
Combitipps	Eppendorff (Hamburg, D)
Counter AC-12	Hecht-ASSISTANT (Altnau, CH)
Drigalski Spatel	Roth (Karlsruhe, D)
Einmal-Skalpell 11 mini	Feather (Osaka, J)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
FACS-Röhrchen (Polystyren, Polypropylen)	Falcon/BD Biosciences (Heidelberg, D)
Gefrierschrank -20 ° C	Liebherr (Bulle, CH)
Gefrierschrank -80 ° C	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)
Gefrierschrank -80 ° C	Sanyo (München, D)
Glaswaren	Schott Duran, Brand (Wertheim, D)
Hybridisierungssofen OV3	Biometra Whatman (Göttingen, D)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle, CH)
Kaltlichtleuchte KL 1500 LCD	Leica (Solms, D)
Katheter 26 gauge	ABBOCATH, Hospira (Gligo, IRL)
Kanülen 30 gauge, 24 gauge	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Kanüle für intragastrale Applikation (20 gauge, 38 mm, gerade)	Harvard Apparatus (Massachusetts, USA)
Kryoröhrchen	Brand (Wertheim, D)
Magnetrührer RCT basic	IKA (Staufen, D)
96 well Mikrotiterplatten	TPP (Trasadingen, CH)
96 well Mikrotiterplatten (flexibel)	Falcon/BD Biosciences (Heidelberg, D)
S-Monovetten (Li-Heparin)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Müllbeutel	Brand (Wertheim, D)
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm <sup>2</sup> Tiefe)	Brand (Wertheim, D)

---

Nylon-Sieb cell strainer 40 µm	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Objekträger	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Omnifix Spritzen	Braun (Melsungen, D)
Pipetboy acu	Integra Biosciences (Chur, CH)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, D)
Einmal-Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäße safe seal 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäße safe seal 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Spritzenadapter-Filter, steril,	Roth (Karlsruhe, D)
Wattestäbchen	Omnilab (Bremen, D)

### 8.1.1 Mikroskope

Stereomikroskop Leica MS 5	Leica (Solms, D)
Lichtmikroskop DM 1000	Leica (Solms, D)

### 8.1.2 Zentrifugen

Heraeus Multifuge 3 S_R	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)
Heraeus BIOFUGE fresco	Kendro Laboratory Products (Hanau, D)

### 8.2 Operationszubehör

Anästhesiegasversorgungseinheit	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Blutdrucktransducer	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Braunoderm	Braun (Melsungen, D)
DC-Messverstärker (zur Anzeige des mittleren Blutdrucks)	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Harvard Pump 11 Plus	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Inhalationsanästhesie Maske	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Inhalationsnarkotika Verdampfer	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)

Inhalationsanästhesie- Einleitungsröhre	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
7-0 Perma-Hand Ethicon Faden	Johnson & Johnson (Woluwe, B)
5-0 Naturseide Faden	atgut (Markneukirchen, D)
Operationsbesteck (Pinzetten, Schere, Nadelhalter)	FST (Heidelberg, D)
Octenisept	Schülke & Mayr (Norderstedt, D)
Polyethyleneschlauch	Smith Medical (Kent, UK)
Rasierer	Indulab (Gams, CH)
Skalpell	Feather (Osaka, J)

### **8.3 Protein Gelelektrophorese und Western Blot**

Gel Kassette Criterion	BIORAD (München, D)
PowerPac™ HC Power Supply	BIORAD (München, D)
Trans-Blot® SD Semi-Dry	BIORAD (München, D)
PVDF Membran Immobilon	Millipore (Billerica, USA)
PP Reagiergefäße, 14 ml, steril	Greiner Bio one (Solingen-Wald, D)
serologische Pipetten, steril	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Schüttler WT 12	Biometra Whatman (Göttingen, D)
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH (Schwabach, D)
Chemismart 5000	Vilber Lourmat (Eberhardzell, D)

### **8.4 Infektion, BAL, Lungenhomogenat und CFU Bestimmung**

Blutagarplatten (Columbia)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Einmal-Cytofunnel Shandon	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Einmal-Insulinspritze mit integrierter Nadel (Omnican)	Braun (Melsungen, D)
Homogenisierstab IKA T10 basic Ultraturrax	IKA (Staufen, D)
Reagiergefäße 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäße 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Sensorturn	Roth (Karlsruhe, D)
Spritzen 1, 5, 10, 20 ml steril	Braun (Melsungen, D)
Trachealintubationsständer	Föhr Medical Instruments (Seeheim, D)
Zytozentrifuge Cytospin 4	Thermo Scientific (Waltham, USA)

### **8.5 Software**

Bio-1-D Software	Vilber Lourmat (Eberhardzell, D)
SoftMaxPro Software	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)

### **8.6 Reagenzien**

Accutase	PAA (Paching, Österreich)
Annexin Binding Buffer	BD Pharmingen (San Jose, USA)
Aprotinin	Sigma (München, D)
Azur Eosin-Methylenblau Lösung	Merck (Darmstadt, D)
BCA Protein Assay Kit	Pierce Protein Research Products (Waltham, USA)
BSA	Sigma (München, D)
DMSO	Roth (Karlsruhe, D)
Dulbecco`s PBS 10x	PAA (Paching, Österreich)
ECL Reagenz pus	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
EDTA, versen	Biochrom (Berlin, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
FCS fetal bovine serum gold	PAA (Paching, A)
Giemsa	
Glucose	Invitrogen (Darmstadt, D)
Hank`s balanced salt solution (HBSS) ohne Phenolrot	PAA (Paching, Österreich)
HEPES	Invitrogen (Darmstadt, D)
Isotonische Natrium-Chlorid Lösung 0,9%	Braun (Melsungen, D)
Jonosteril	Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)

---

KHCO <sub>3</sub>	Merck (Darmstadt, D)
Laemmli`s Protein Ladepuffer	BIORAD (München, D)
L-Glutamin	Invitrogen (Darmstadt, D)
Leupeptin	Sigma (München, D)
LPS	Sigma (München, D)
May-Grünwald`s	Merck (Darmstadt, D)
Eosin-Methylenblau Lösung	
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Darmstadt, D)
Milchpulver blotting grade	Roth (Karlsruhe, D)
Na-Azid	Sigma (München, D)
Natrium-Bicarbonat	PAA (Paching, A)
Na-EDTA, Titriplex III	Merck (Darmstadt, D)
Natrium-Orthovanadat	Sigma (München, D)
Natrium-Pyruvat	PAA (Paching, A)
NH <sub>4</sub> Cl	Merck (Darmstadt, D)
Octagam	Octapharma (Langenfeld, D)
PEG 400	Roth (Karlsruhe, D)
Phagotest™	Orpegen (Heidelberg, D)
Pen/Strep	Invitrogen (Darmstadt, D)
PMSF	Roth (Karlsruhe, D)
Precision plus Protein Standard Dual Color	BIORAD (München, D)
Propidiumjodid	BD Pharmingen (San Jose, USA)
RPMI 1640 mit Phenolrot, ohne L-Glutamin	PAA (Paching, A)
20 % SDS Rotistock	Roth (Karlsruhe, D)
Todd-Hewitt-Broth (THB)	Oxoid (Basingstoke, UK)
Titriplex III	Merck (Darmstadt, D)
Tween 20 molecular biology grade	Promega (Madison, USA)

### **8.7 Narkose**

Desfluran	Baxter (Deerfield, USA)
Isofluran	Baxter (Deerfield, USA)
Ketamin	aniMedica GmbH (Senden Bösensell, D)
Rompun	Bayer (Leverkusen, D)

### **8.8 Antikörper**

F4/80 FITC	AbD Serotec (Düsseldorf, D)
p38 MAP Kinase (1:1000 verdünnt)	Cell Signaling Technology
Phospho-p38 MAPK (1:1000 verdünnt)	Cell Signaling Technology
Peroxidase-konjugiertes AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG 1:10.000 verdünnt	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

### **8.9 Inhibitoren**

BIRB 796	Axon Medchem (Groningen, NL)
SB203580	Jena Bioscience (Jena, D)

### **8.10 ELISA**

HMGB1 ELISA Kit	IBL (Hamburg, D)
IL-6, IL-10, IL-1Ra, TNF- $\alpha$ , MIP-2 und KC ELISA Kits	R&D Systems (Minneapolis, USA)

## 8.11 Zellkultur

MH-S Zellen	ATCC (Wesel, D)
MH-S Zellkulturmedium	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 5 ml Pen/Strep 1,5 g/l Natrium-Bicarbonat 4,5 g/l Glucose 10 mM HEPES 1 mM Natrium-Pyruvat 500 µl β-Mercaptoethanol 10% FCS steril filtrieren
Zellkulturflaschen T25, T75	Greiner Bio one (Solingen-Wald, D)
48-well Zellkulturplatte	Greiner Bio one (Solingen-Wald, D)

## 8.12 Puffer

### 8.12.1 Western Blot

Lyse-Puffer	20 mM HEPES, pH 7,7 50 mM NaF 50 mM NaCl 1% Triton-X-100 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin in Aqua dest. lösen, vor Benutzung da- zu geben: 0,5 mM PMSF in Ethanol gelöst 0,1 % Na-Orthovanadat
PBS 1x	10 x PBS    100 ml Aqua dest.    900 ml

---

0,05 % PBST	1 x PBS 0,05 % Tween 20
1 % Milchpulver in PBST	Milchpulver 1 g 0,05 % PBST 100 ml
5 % Milchpulver in PBST	Milchpulver 5 g 0,05 % PBST 100 ml
Stripping Solution	10 % SDS 1M Tris/HCl pH 6,7 + 0,7 % 2-Mercaptoethanol
<b>8.12.2 FACS Analysen</b>	
Annexin Binding Buffer	1:10 mit Aqua dest. verdünnt
Erylyse (10x)	NH <sub>4</sub> Cl 82,6 g KHCO <sub>3</sub> 10,0 g Titriplex 0,42 g mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen pH 7,4
FACS-Puffer	BSA 5 g 2 % Na-Azidlösung 5 ml mit 1 x PBS auf 500 ml auffüllen
Octagam	1:5 mit FACS-Puffer verdünnt
Propidiumjodid	1 mg/ml in 1 x PBS gelöst Gebrauchslösung: 1:20 mit 1 x PBS verdünnt

### 8.12.3 BAL

PBS/EDTA

46,3 ml 1 x PBS

3,7 ml EDTA versen

pH 7,2 mit NaOH einstellen

## 9. Literaturverzeichnis

1. Wick, M., A. Ekkernkamp, and G. Muhr, *[The epidemiology of multiple trauma]*. Chirur, 1997. **68**(11): p. 1053-8.
2. Tscherne, H., H.J. Oestern, and J.A. Sturm, *[Stress tolerance of patients with multiple injuries and its significance for operative care]*. Langenbecks Arch Chir, 1984. **364**: p. 71-7.
3. Spahn, D.R., et al., *Management of bleeding following major trauma: a European guideline*. Crit Care, 2007. **11**(1): p. R17.
4. Angele, M.K. and I.H. Chaudry, *Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches*. Langenbecks Arch Surg, 2005. **390**(4): p. 333-41.
5. Ni Choileain, N. and H.P. Redmond, *The immunological consequences of injury*. Surgeon, 2006. **4**(1): p. 23-31.
6. Ni Choileain, N. and H.P. Redmond, *Cell response to surgery*. Arch Surg, 2006. **141**(11): p. 1132-40.
7. Lenz, A., G.A. Franklin, and W.G. Cheadle, *Systemic inflammation after trauma*. Injury, 2007. **38**(12): p. 1336-45.
8. Kimura, F., et al., *Immunosuppression following surgical and traumatic injury*. Surg Today, 2010. **40**(9): p. 793-808.
9. Heckbert, S.R., et al., *Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients*. J Trauma, 1998. **45**(3): p. 545-9.
10. Faist, E., et al., *Multiple organ failure in polytrauma patients*. J Trauma, 1983. **23**(9): p. 775-87.

11. Brochner, A.C. and P. Toft, *Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2009. **17**: p. 43.
12. Bahrami, S., et al., *Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 2): p. H2219-26.
13. Jarrar, D., I.H. Chaudry, and P. Wang, *Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review)*. Int J Mol Med, 1999. **4**(6): p. 575-83.
14. Jarrar, D., et al., *Inhibition of tyrosine kinase signaling after trauma-hemorrhage: a novel approach for improving organ function and decreasing susceptibility to subsequent sepsis*. Ann Surg, 2000. **231**(3): p. 399-407.
15. Hoover, L., et al., *Systemic inflammatory response syndrome and nosocomial infection in trauma*. J Trauma, 2006. **61**(2): p. 310-6; discussion 316-7.
16. Ertel, W., et al., *Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome*. J Trauma, 1995. **39**(5): p. 879-85; discussion 885-7.
17. Ulvik, A., et al., *Multiple organ failure after trauma affects even long-term survival and functional status*. Crit Care, 2007. **11**(5): p. R95.
18. Decker, D., et al., *Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma*. Surgery, 1996. **119**(3): p. 316-25.
19. Vollmar, B., *[Pathophysiological basis of surgery-linked sepsis]*. Chirurg, 2011. **82**(3): p. 199-207.

20. Bone, R.C., 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. **101**(6): p. 1644-55.
21. Bone, R.C., *Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome).* JAMA, 1992. **268**(24): p. 3452-5.
22. Angele, M.K., C.P. Schneider, and I.H. Chaudry, *Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock.* Crit Care, 2008. **12**(4): p. 218.
23. Rossaint, R., et al., *Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline.* Crit Care, 2010. **14**(2): p. R52.
24. Moore, F.A. and E.E. Moore, *Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure.* Surg Clin North Am, 1995. **75**(2): p. 257-77.
25. Hietbrink, F., et al., *Trauma: the role of the innate immune system.* World J Emerg Surg, 2006. **1**: p. 15.
26. Keel, M. and O. Trentz, *Pathophysiology of polytrauma.* Injury, 2005. **36**(6): p. 691-709.
27. Stahel, P.F., W.R. Smith, and E.E. Moore, *Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma.* Injury, 2007. **38**(12): p. 1409-22.
28. Sibille, Y. and H.Y. Reynolds, *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury.* Am Rev Respir Dis, 1990. **141**(2): p. 471-501.
29. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.

30. Levy, R.M., et al., *Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(4): p. R1538-44.
31. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
32. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
33. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
34. Rubartelli, A. and M.T. Lotze, *Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox*. Trends Immunol, 2007. **28**(10): p. 429-36.
35. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
36. Dumitriu, I.E., et al., *HMGB1: guiding immunity from within*. Trends Immunol, 2005. **26**(7): p. 381-7.
37. Harris, H.E. and A. Rautava, *Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1*. EMBO Rep, 2006. **7**(8): p. 774-8.
38. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N3-12.
39. Biffi, W.L., et al., *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?* Ann Surg, 1996. **224**(5): p. 647-64.
40. Baigrie, R.J., et al., *Systemic cytokine response after major surgery*. Br J Surg, 1992. **79**(8): p. 757-60.

41. Ayala, A., et al., *Differential alterations in plasma IL-6 and TNF levels after trauma and hemorrhage*. Am J Physiol, 1991. **260**(1 Pt 2): p. R167-71.
42. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
43. Klava, A., et al., *Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression*. Arch Surg, 1997. **132**(4): p. 425-9.
44. Laichalk, L.L., J.M. Danforth, and T.J. Standiford, *Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **15**(4): p. 181-7.
45. Steinhauser, M.L., et al., *IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 392-9.
46. Lin, E., S.E. Calvano, and S.F. Lowry, *Inflammatory cytokines and cell response in surgery*. Surgery, 2000. **127**(2): p. 117-26.
47. Gale, L.M. and S.R. McColl, *Chemokines: extracellular messengers for all occasions?* Bioessays, 1999. **21**(1): p. 17-28.
48. Holmes, M.C., et al., *Neutrophil modulation of the pulmonary chemokine response to lipopolysaccharide*. Shock, 2002. **18**(6): p. 555-60.
49. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat, *The role of neutrophils and monocytes in innate immunity*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 118-46.
50. van Furth, R., et al., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.

51. Maus, U.A., et al., *Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(2): p. 227-35.
52. Taut, K., et al., *Macrophage Turnover Kinetics in the Lungs of Mice Infected with Streptococcus pneumoniae*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(1): p. 105-13.
53. Gordon, S.B. and R.C. Read, *Macrophage defences against respiratory tract infections*. Br Med Bull, 2002. **61**: p. 45-61.
54. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S9-17.
55. Stephan, R.N., et al., *Mechanism of immunosuppression following hemorrhage: defective antigen presentation by macrophages*. J Surg Res, 1989. **46**(6): p. 553-6.
56. Silva, M.T., *When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 93-106.
57. Botha, A.J., et al., *Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window*. Surgery, 1995. **118**(2): p. 358-64; discussion 364-5.
58. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
59. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
60. Gaestel, M., A. Kotlyarov, and M. Kracht, *Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(6): p. 480-99.

61. Krishna, M. and H. Narang, *The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(22): p. 3525-44.
62. Liu, Y., E.G. Shepherd, and L.D. Nelin, *MAPK phosphatases--regulating the immune response*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 202-12.
63. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.
64. Obata, T., G.E. Brown, and M.B. Yaffe, *MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway*. Crit Care Med, 2000. **28**(4 Suppl): p. N67-77.
65. Ashwell, J.D., *The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 532-40.
66. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
67. Rosengart, M.R., et al., *Mitogen-activated protein kinases in the intensive care unit: prognostic potential*. Ann Surg, 2003. **237**(1): p. 94-100.
68. Song, G.Y., et al., *Evolution of an immune suppressive macrophage phenotype as a product of P38 MAPK activation in polymicrobial sepsis*. Shock, 2001. **15**(1): p. 42-8.
69. Song, G.Y., et al., *MAPK p38 antagonism as a novel method of inhibiting lymphoid immune suppression in polymicrobial sepsis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(2): p. C662-9.
70. Abraham, E., *Alterations in cell signaling in sepsis*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S459-64.
71. Welte, T., *[Community-acquired pneumonia]*. Internist (Berl), 2009. **50**(3): p. 331-9; quiz 340.

72. Kadioglu, A., et al., *The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(4): p. 288-301.
73. Kadioglu, A. and P.W. Andrew, *The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story*. Trends Immunol, 2004. **25**(3): p. 143-9.
74. Bowers, E.F. and L.R. Jeffries, *Optochin in the identification of str. pneumoniae*. J Clin Pathol, 1955. **8**(1): p. 58-60.
75. AlonsoDeVelasco, E., et al., *Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines*. Microbiol Rev, 1995. **59**(4): p. 591-603.
76. Henrichsen, J., *Six newly recognized types of Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(10): p. 2759-62.
77. Lynch, J.P., 3rd and G.G. Zhanel, *Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines*. Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(3): p. 217-25.
78. Nelson, A.L., et al., *Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 83-90.
79. van der Poll, T. and S.M. Opal, *Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia*. Lancet, 2009. **374**(9700): p. 1543-56.
80. Hirst, R.A., et al., *The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(2): p. 195-201.
81. Malley, R., et al., *Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1966-71.

82. Calbo, E. and J. Garau, *Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections*. *Curr Opin Infect Dis*, 2011. **24**(3): p. 241-7.
83. Welte, T., *Die nosokomiale Pneumonie*. *Intensivmed*, 2006. **43**: p. 301-309.
84. Papia, G., et al., *Infection in hospitalized trauma patients: incidence, risk factors, and complications*. *J Trauma*, 1999. **47**(5): p. 923-7.
85. Manderscheid, P.A., et al., *Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004. **11**(4): p. 742-51.
86. Bochicchio, G.V., et al., *Systemic inflammatory response syndrome score at admission independently predicts infection in blunt trauma patients*. *J Trauma*, 2001. **50**(5): p. 817-20.
87. Gastmeier, P., et al., *Early- and late-onset pneumonia: is this still a useful classification?* *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(7): p. 2714-8.
88. Muehlstedt, S.G., et al., *Cytokines and the pathogenesis of nosocomial pneumonia*. *Surgery*, 2001. **130**(4): p. 602-9; discussion 609-11.
89. Angele, M.K. and E. Faist, *Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection*. *Crit Care*, 2002. **6**(4): p. 298-305.
90. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
91. Badger, A.M., et al., *Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **279**(3): p. 1453-61.

92. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
93. Pargellis, C., et al., *Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(4): p. 268-72.
94. Kuma, Y., et al., *BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19472-9.
95. Mbawuike, I.N. and H.B. Herscowitz, *MH-S, a murine alveolar macrophage cell line: morphological, cytochemical, and functional characteristics*. J Leukoc Biol, 1989. **46**(2): p. 119-27.
96. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
97. Martin, C., et al., *Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma*. Crit Care Med, 1997. **25**(11): p. 1813-9.
98. Roumen, R.M., et al., *Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure*. Ann Surg, 1993. **218**(6): p. 769-76.
99. Lyons, A., et al., *Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection*. Ann Surg, 1997. **226**(4): p. 450-8; discussion 458-60.
100. Sherry, R.M., et al., *Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients*. J Trauma, 1996. **40**(4): p. 613-6; discussion 616-7.
101. Rendon-Mitchell, B., et al., *IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3890-7.

102. Cohen, M.J., 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): p. R174.
103. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P.A. Ward, *Novel strategies for the treatment of sepsis*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 517-24.
104. Carter, A.B., M.M. Monick, and G.W. Hunninghake, *Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 751-8.
105. Jarrar, D., et al., *Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF-kappaB and MAPK/ERK mechanisms*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L799-805.
106. Khadaroo, R.G., et al., *Impaired activation of mitogen-activated protein kinases after hemorrhagic shock*. Surgery, 2002. **132**(2): p. 360-4.
107. Thobe, B.M., et al., *Src family kinases regulate p38 MAPK-mediated IL-6 production in Kupffer cells following hypoxia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(3): p. C476-82.
108. Faist, E., et al., *Alteration of monocyte function following major injury*. Arch Surg, 1988. **123**(3): p. 287-92.
109. Faist, E., et al., *Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation*. Arch Surg, 1986. **121**(9): p. 1000-5.
110. Hensler, T., et al., *Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery*. Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2283-91.
111. Meakins, J.L., et al., *Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma*. Ann Surg, 1977. **186**(3): p. 241-50.

112. Miller-Graziano, C.L., et al., *Mechanisms of altered monocyte prostaglandin E2 production in severely injured patients*. Arch Surg, 1988. **123**(3): p. 293-9.
113. Olszewski, M.A., et al., *Effect of laparotomy on clearance and cytokine induction in Staphylococcus aureus infected lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(9): p. 921-9.
114. Ayala, A., W. Ertel, and I.H. Chaudry, *Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes*. Shock, 1996. **5**(2): p. 79-90.
115. Schinkel, C., et al., *Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis*. J Trauma, 1998. **44**(5): p. 743-8; discussion 748-9.
116. Muehlstedt, S.G., M. Lyte, and J.L. Rodriguez, *Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia*. Shock, 2002. **17**(6): p. 443-50.
117. Chaudry, I.H., et al., *Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects*. Am J Physiol, 1990. **259**(4 Pt 2): p. R663-78.
118. Ayala, A., et al., *Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release*. Arch Surg, 1994. **129**(11): p. 1172-8.
119. Namas, R., et al., *An adequately robust early TNF-alpha response is a hallmark of survival following trauma/hemorrhage*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8406.
120. Yao, Y.M., et al., *The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure*. Inflamm Res, 1998. **47**(5): p. 201-10.
121. DeMaria, E.J., J.V. Pellicane, and R.B. Lee, *Hemorrhagic shock in endotoxin-resistant mice: improved survival unrelated to deficient produc-*

- tion of tumor necrosis factor*. J Trauma, 1993. **35**(5): p. 720-4; discussion 724-5.
122. Karakozis, S., et al., *The effects of interleukin-10 in hemorrhagic shock*. J Surg Res, 2000. **90**(2): p. 109-12.
123. Su, J., et al., *SB203580, a p38 inhibitor, improved cardiac function but worsened lung injury and survival during Escherichia coli pneumonia in mice*. J Trauma, 2010. **68**(6): p. 1317-27.

## **Erklärung zur Dissertation**

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Rolle der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase im Mausmodell der post-  
traumatischen Immunsuppression und konsekutiven Pneumonie“**

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

**Curriculum vitae**

Name	Nadine Ding
Geburtsdatum	07 November 1979
Geburtsort	Wolfenbüttel
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Eltern	Gerald Ding Martina Oeft

**Schulischer Werdegang**

1986 - 1990	Grundschule Veltenhof, Braunschweig
1990 - 1992	Orientierungsstufe Wenden, Braunschweig
1992 - 1995	Lessing Gymnasium Wenden, Braunschweig
1995 - 1999	Gymnasium Ricarda-Huch-Schule, Braunschweig
1999	Abitur Gymnasium Ricarda-Huch-Schule, Braunschweig

**Beruflicher Werdegang**

2001-2006	Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
10/2006	Diplomarbeit
2006	Abschluss als <i>Diplom-Humanbiologin</i>
seit 10/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung für Experimentelle Pneumologie, Medizinische Hochschule Hannover Beginn der Dissertation zum Dr. rer. nat.

## Publikationsliste

Schreiber O, Steinwede K, **Ding N**, Srivastava M, Maus R, Langer F, Prokein J, Ehlers S, Welte T, Gunn MD and Maus UA Mice that overexpress CC chemokine ligand 2 in their lungs show increased protective immunity to infection with *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. **J Infect Dis** 198: 1044-1054, 2008.

Herbold W, Maus R, Hahn I, **Ding N**, Srivastava M, Christman JW, Mack M, Reutershan J, Briles DE, Paton JC, Winter C, Welte T and Maus UA. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. **Infect Immun** 78: 2620-2630, 2010.

Hahn I, Klaus A, Janze AK, Steinwede K, **Ding N**, Bohling J, Brumshagen C, Serrano H, Gauthier F, Paton JC, Welte T and Maus. Cathepsin G and neutrophil elastase play critical and non-redundant roles in lung protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* in mice. **Infect. Immun.** doi:10.1128/IAI.05593-11, 2011.

Weber M, Lambeck S, **Ding N**, Henken S, Kohl M, Deigner HP, Enot DP, Emeka II, Frappart L, Kiehntopf M, Claus RA, Kamradt T, Weih D, Vodovotz Y, Briles DE, Ogunniyi AD, Paton JC, Maus UA and Bauer M. Hepatic Induction of Cholesterol Biosynthesis Reflects a Remote Adaptive Response to Pneumococcal Pneumonia. **FASEBJ**, in Revision 2011.

**Ding N**, Dahlke K, Janze AK, Mailer PC, Maus R, Bohling J, Welte T, Bauer M, Riedemann NC and Maus UA. The role of p38 MAPK in trauma-hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. Zur Publikation eingereicht 2011.

**Vorträge (V) und Posterbeiträge (P)**

**1 (P) Ding N** & Dahlke K, Janze AK, Sommerfeld O, Maus UA & Riedemann NC. Role of p38 MAPK in trauma-hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. 4<sup>th</sup> International Congress Sepsis and Multiorgan dysfunction 2009, Weimar.

**2 (V) Ding N** & Dahlke K, Janze AK, Sommerfeld O, Maus UA & Riedemann NC. Role of p38 MAPK in trauma-hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2009, Borstel.

**3 (P) Ding N**, Dahlke K, Janze AK, Sommerfeld O, Riedemann NC and Maus UA. Role of p38 MAPK in trauma-hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V, 2010, Hannover.

**4 (P) Ding N**, Dahlke K, Janze A, Mailer P, Welte T, Riedemann NC and Maus UA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in trauma/hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. European Respiratory Society (ERS), Barcelona, Spanien, 2010.

**5 (V) Ding N**, Dahlke K, Janze A, Mailer P, Welte T, Riedemann NC and Maus UA. Role of p38 MAPK in trauma/hemorrhage and subsequent pneumococcal pneumonia. Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2010, Berlin.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde in der Abteilung der Experimentellen Pneumologie, Medizinische Hochschule Hannover angefertigt. An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Maus, der mir dieses interessante und umfangreiche Thema überlassen hat und mich jederzeit außerordentlich gut und mit großem Engagement betreute. Mit seinem Interesse an dieser Arbeit, konstruktiver Kritik und vielen wertvollen Ratschlägen hat er wesentlich am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt.

Prof. Dr. Niels Riedemann danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die hilfreichen Tipps rund um das Paper.

Prof. Dr. Tobias Welte danke ich für viele hilfreiche Anregungen und für das Gegenlesen des Papers.

Von ganzem Herzen dankbar bin ich meinen beiden lieben Arbeitskolleginnen Ann-Kathrin Janze und Petra Mailer, ohne deren tatkräftige Unterstützung und Geduld diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei Regina Maus, Jennifer Bohling und allen anderen Mitarbeitern aus der Abteilung für Experimentelle Pneumologie für ihre exzellente Mithilfe an dieser Arbeit und das stets gute und fröhliche Arbeitsklima.

Ganz besonders und von Herzen danken möchte ich meinen lieben Großeltern und meiner Mutter, die mich jederzeit großzügig unterstützt haben und mir diesen Weg erst ermöglichten. Ich danke für das Interesse, zahlreiche Motivationshilfen und die Hilfestellungen über die gesamten Jahre meines Studiums und im Laufe dieser Arbeit.