

Fakultät für Medizin, Technische Universität München

Name der promotionsführenden Einrichtung

„Die Interaktion von Thrombozyten und regulatorischen CD4⁺ T-Helferzellen über direkten Zellkontakt via CD40-Ligand und P-Selektin nach Trauma – eine murine in-vivo Analyse“

Titel der wissenschaftlichen Abhandlung

Marco-Christopher Rupp

Vorname und Name

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung

der Fakultät der Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende/-r der Dissertation:

1. PD Dr. med Marc Hanschen, MBA

2. Prof. Dr. med Percy Knolle

3. Prof. Dr. med Barbara Wollenberg

Die Dissertation wurde am 10.02.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die promotionsführende Einrichtung

Fakultät für Medizin angenommen.

1	Inhaltsverzeichnis	
2	Abbildungsverzeichnis	IV
3	Tabellenverzeichnis	VI
4	Abkürzungsverzeichnis	VII
5	Einleitung	12
5.1	<i>Die Relevanz der Trauma-Immunologie</i>	12
5.1.1	Die gesellschaftliche Relevanz traumatischer Verletzungen	12
5.1.2	Spektrum, Verlauf und Therapiekonzepte bei traumatischen Verletzungen	12
5.1.3	Die immunologische Dysbalance nach traumatischen Verletzungen	13
5.1.4	Das systemische inflammatorische Response-Syndrom	14
5.1.5	Das kompensatorische antiinflammatorische Response-Syndrom	15
5.1.6	Die Rolle immunologischer Forschung in der Versorgung von Traumapatienten	17
5.2	<i>Wichtige Zelltypen nach Trauma</i>	17
5.2.1	Regulatorische CD4 ⁺ T-Zellen	17
5.2.2	Thrombozyten	24
5.2.3	Die Interaktion von CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten nach Trauma	31
5.2.4	Die Forschung zu posttraumatischen immunologischen Prozessen	33
5.3	<i>Die posttraumatische Interaktion von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten</i>	34
5.3.1	Der aktuelle Stand der Forschung zu Mechanismen der Interaktion	34
5.3.2	Potenzielle Signalwege für eine Interaktion im direkten Zell-Zellkontakt	34
5.3.3	Die Rolle von CD40-Ligand in Immunologie und Hämostase	35
5.3.4	Die Rolle von P-Selektin in Immunologie und Hämostase	37
6	Fragestellungen und Hypothesen	38
6.1	<i>Wird die frühe posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt via CD40-Ligand moduliert?</i>	39
6.2	<i>Wird die thrombozytäre Funktion nach Trauma CD40L-abhängig moduliert?</i>	39
6.3	<i>Wird die frühe posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt via P-Selektin moduliert?</i>	39
6.4	<i>Wird die thrombozytäre Funktion nach Trauma P-Selektin-abhängig moduliert?</i>	39
7	Material und Methoden	40
7.1	<i>Vorbemerkungen</i>	40
7.2	<i>Versuchstiere</i>	40
7.3	<i>Reagenzien</i>	41
7.3.1	Chemikalien und Puffer	41
7.3.2	Antikörper	42
7.4	<i>Medikamente</i>	43
7.5	<i>Geräte</i>	43
7.6	<i>Traumamodell</i>	44
7.6.1	Analgesie und Narkose	44
7.6.2	Traumatische Intervention	45
7.6.3	Scheinintervention	46

7.6.4	Euthanasie	46
7.7	<i>Messung der Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen</i>	47
7.7.1	Gewebeaufbereitung	47
7.7.2	Phospho-Durchflusszytometrie	48
7.8	<i>Messung der hämostatischen Parameter</i>	54
7.8.1	Blutentnahme	54
7.8.2	Rotationsthromboelastometrie	55
7.9	<i>Versuchsprotokolle</i>	57
7.9.1	Validation des Knockout-Modells für die Arbeit	57
7.9.2	Phospho-Durchflusszytometrie der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei Wildtyptieren	58
7.9.3	Phospho-Durchflusszytometrie der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L-Gendefizienz	60
7.9.4	Phospho-Durchflusszytometrie der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz	60
7.9.5	Rotationsthromboelastometrie in Wildtyptieren	62
7.9.6	Rotationsthromboelastometrie bei CD40-Gendefizienz	63
7.9.7	Rotationsthromboelastometrie bei P-Selektin Gendefizienz	63
7.10	<i>Statistische Analyse</i>	64
7.11	<i>Abbildungen</i>	65
8	Ergebnisse	66
8.1	<i>Validation des Gen-Knockout Modells</i>	66
8.1.1	Die Zellpopulationen bei CD40-Ligand-Knockout	66
8.1.2	Die Zellpopulationen bei P-Selektin-Knockout	68
8.2	<i>Posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen</i>	70
8.3	<i>Der Einfluss von CD40-Ligand auf die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten</i>	72
8.3.1	Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L Gendefizienz	72
8.3.2	Veränderung der hämostatischen Funktion der Thrombozyten bei CD40L Gendefizienz	78
8.4	<i>Der Einfluss von P-Selektin auf CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten</i>	80
8.4.1	Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz	80
8.4.2	Veränderung der hämostatische Funktion der Thrombozyten bei P-Selektin Gendefizienz	84
9	Diskussion	87
9.1	<i>Diskussion der Methodik</i>	88
9.1.1	Versuchstiere	88
9.1.2	Narkose und Analgesie	89
9.1.3	Traumamodell	90
9.1.4	Messung der Aktivität der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen	91
9.1.5	Rotationsthromboelastometrie	97
9.1.6	Limitation der Methodik	98
9.2	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	100
9.2.1	Validität des Knockout-Modell	100
9.2.2	Posttraumatische Aktivierung der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen	103

9.2.3	Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L Gendefizienz.....	109
9.2.4	Einfluss von CD40L auf die hämostatische Funktion der Thrombozyten	117
9.2.5	Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4 ⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz.....	119
9.2.6	Einfluss P-Selektin-abhängiger Signalwege auf die hämostatische Funktion der Thrombozyten	126
9.2.7	Der klinische Ausblick	128
10	Schlussfolgerung.....	132
11	Zusammenfassung.....	133
12	Literaturverzeichnis.....	138
13	Danksagung.....	157
14	Veröffentlichungen.....	158
14.1	<i>Originalarbeiten.....</i>	158
14.2	<i>Abstracts / Kongressbeiträge</i>	160

2	Abbildungsverzeichnis	
Abbildung 1	Traumatische Verletzungen resultieren in einer Dysbalance des Immunsystems	16
Abbildung 2	Eine Depletion der Thrombozyten ist mit einer Störung der posttraumatischen Aktivierung verbunden.	33
Abbildung 3	CD40L-abhängige T-Zell-Aktivierung	36
Abbildung 4	Aktivierungsprozess des thrombozyten-basierten P-Selektins	38
Abbildung 5	Schematischer Versuchsaufbau	44
Abbildung 6	Aufbau der Halterung für die Intervention	45
Abbildung 7	Zeitlicher Ablauf der Intervention	46
Abbildung 8	Gating-Strategie	51
Abbildung 9	Die Höhe der Autofluoreszenz einer Probe korreliert mit der Stärke des Fluoreszenzsignals der CD4 ⁺ Tregs	52
Abbildung 10	ROTEM®-Parameter	56
Abbildung 11	Schematische Darstellung der Hypothesen und der eingesetzten Studienarme	57
Abbildung 12	Gesamtzellpopulation in Wildtyptieren und CD40L-gendefizienten Tieren	66
Abbildung 13	CD4 ⁺ Treg Zellpopulation in Wildtyptieren und CD40L-gendefizienten Tieren	67
Abbildung 14	Anteil der CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtzellpopulation bei Wildtyptieren und CD40L-gendefizienten Tieren	67
Abbildung 15	Unterschiede in der Gesamtzellpopulation und der CD4 ⁺ Treg Zellpopulation zwischen Wildtyptieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren	68
Abbildung 16	Unterschiede in der Gesamtzellpopulation und der CD4 ⁺ Treg Zellpopulation zwischen Wildtyptieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren	69
Abbildung 17	Anteil der CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtzellpopulation bei Wildtyptieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren	69
Abbildung 18	Die Phospho-Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse der posttraumatischen CD4 ⁺ - Treg-Aktivierung	70
Abbildung 19	RFI in drainierenden Lymphknoten bei Wildtyptieren nach Schein- und Verbrennungstrauma	71
Abbildung 20	RFI im Milzgewebe bei Wildtyptieren nach Schein- und Verbrennungstrauma	72
Abbildung 21	RFI-Messung bei CD40L-Gen-Knockout im Lymphgewebe	73
Abbildung 22	RFI-Messung bei CD40L-Gen-Knockout im Milzgewebe	75
Abbildung 23	Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter bei CD40L-Gen-Defizienz	79
Abbildung 24	RFI-Messung bei P-Selektin-Gen-Knockout im Lymphgewebe	81
Abbildung 25	RFI-Messung bei P-Selektin-Gen-Knockout im Milzgewebe	82
Abbildung 26	Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter bei P-Selektin Gendefizienz	85
Abbildung 27	Schematisches Konzept einer CD40L-abhängigen kostimulatorischen CD4 ⁺ Treg-Aktivierung durch Thrombozyten in drei Schritten	112
Abbildung 28	Parakrine CD40L-abhängige Interaktion von CD4 ⁺ Tregs und Thrombozyten über RANTES	113

Abbildung 29 Parakrine P-Selektin-abhängige Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über TNF α /TNFR2, Alarmine und RANTES 121

3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Übersicht der Inhaltsstoff der α-Granula</i>	27
<i>Tabelle 2 In den verschiedenen Studienarmen eingesetzte Mausstämme</i>	40
<i>Tabelle 3 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Chemikalien und Puffer</i>	41
<i>Tabelle 4 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Antikörper</i>	42
<i>Tabelle 5 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Medikamente</i>	43
<i>Tabelle 6 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei Wildtyp-Tieren</i>	59
<i>Tabelle 7 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L-Gendefizienz</i>	60
<i>Tabelle 8 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz</i>	61
<i>Tabelle 9 Versuchsgruppen für Rotationsthromboelastometrie in Wildtyp-Tieren</i>	62
<i>Tabelle 10 Versuchsgruppen für Rotationsthromboelastometrie bei CD40-Gendefizienz</i>	63
<i>Tabelle 11 Versuchsgruppen für Rotationsthromboelastometrie bei P-Selektin Gendefizienz</i>	64
<i>Tabelle 12 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyp-Tieren und CD40L-defizienten Tieren (Lymphgewebe)</i>	74
<i>Tabelle 13 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyp-Tieren und CD40L-defizienten Tieren (Milzgewebe)</i>	75
<i>Tabelle 14 Verhältnis der CD4⁺ Treg Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz bei CD40L^{KO}</i>	76
<i>Tabelle 15 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyp-Tieren und P-Selektin-defizienten Tieren (Lymphgewebe)</i>	81
<i>Tabelle 16 Posttraumatische Aktivierung bei WT-Tieren und P-Selektin-defizienten Tieren (Milzgewebe)</i>	83
<i>Tabelle 17 Verhältnis der foxP3⁺ Zellzellzahlen zwischen Lymphknoten und Milz</i>	83

4 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung **Bedeutung**

ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	(phosphodurchflusszytometrisch) Allophycocyanin
APC	(hämostaseologisch) aktiviertes Protein C
APZ	Antigen präsentierende Zelle
CARS	engl. <i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> , dt. kompensatorisches antiinflammatorisches Response-Syndrom
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> [Fachbegriff], dt. „Unterscheidungsgruppen“
CD40L	CD40-Ligand
CFT	engl. <i>clot formation time</i> , dt. Gerinnselbildungszeit
COPD	engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , dt. chronische obstruktive Lungenerkrankung
CT	engl. <i>clotting time</i> , dt. Gerinnungszeit
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> , dt. zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein
cTregs	engl. <i>central Tregs</i> , dt. zentrale Tregs
CXCL4	Plättchenfaktor 4
DAG	Diacylglycerol
DAMP	engl. <i>damage associated molecular pattern</i> , dt. „schaden-assoziiertes molekulares Muster“
dt.	Deutsch
engl.	Englisch
ERK	engl. <i>extracellular-signal regulated kinase</i> , dt. extrazelluläre signalregulierte Kinase
eTregs	Effektor-Tregs
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i> , dt. fibroblastischer Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , dt. Vorwärtsstreulicht

Gads	<i>Grb2-related adaptor down-stream of Shc</i> , dt. SHC nachgelagerter Grb2-verwandeter Adaptor
GITR	engl. <i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i> , dt. Glucocorticoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GpIb	Glykoprotein Ib
GPVI	Glykoprotein VI
Grb2	engl. <i>growth factor bound receptor protein 2</i> , dt. wachstumsfaktor-gebundenes Rezeptorprotein 2
HMG-1	engl. <i>High-Mobility-Group-Protein 1</i> [Fachbegriff]
HMGB1	engl. <i>High-Mobility-Group-Protein B1</i> [Fachbegriff]
ICAM	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1, engl. <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICOS	induzierbarer T-Zell Kostimulator, engl. <i>inducible T-cell Co-Stimulator</i>
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
INR	engl. <i>International Normalized Ratio</i> [Fachbegriff]
ISS	engl. <i>Injury Severity Score</i> [Fachbegriff]
ITAMs	engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> . dt. Aktivierungsmotive auf der Basis von Immunrezeptortyrosin
iTregs	Induzierte Tregs
JAK3	Janus-Kinase 3
LAG3	Lymphozyten-aktivierende-Gen-3
LAT	engl. <i>linker for activation of T-cells</i> , dt. Linker für die Aktivierung von T-Zellen
LcK	engl. <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> , dt. lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin-Kinase
LFA-1	Lymphozyten-funktionsassoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	engl. <i>Macrophage-1 antigen</i> , dt. Makrophagen-1 Antigen,
MAPK	engl. <i>mitogen activated protein kinases</i> , dt. mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCF	engl. <i>maximum clot firmness</i> , dt. maximale Gerinnselfestigkeit
MCP	engl. <i>monocyte chemoattractant protein</i> , dt. Monozytenattaktionsprotein

MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i> , dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP-1 α	engl. <i>macrophage inflammatory protein-1α</i> [Fachbegriff], dt. entzündliches Makrophagenprotein
MMF	engl. <i>macrophage migratory factor</i> [Fachbegriff], dt. „Hemmfaktor für die Makrophagenmigration“
MODS	Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom
MOV	Multiorganversagen
mTregs	memory-Tregs
N-FAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i> , dt. nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	engl. <i>neutrophil extracellular traps</i> , dt. neutrophile extrazelluläre Fallen
NF- κ B	nukleärer Faktor kappa-B
nTregs	natürlich auftretende Tregs
PAMP	engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i> dt. Pathogen assoziierte molekulare Muster
PAR-4	Protease-aktivierender-Rezeptor-4
PD-1	engl. <i>programmed cell death protein 1</i> , dt. programmiertes Zelltod-Protein 1
PDGF	engl. <i>platelet derived growth factor</i> , dt. Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
PF-4	Plättchenfaktor 4
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C θ
PLC γ 1	Phosphoinositid-Phospholipase C
PMP	engl. <i>platelet microparticles</i> , dt. thrombozytären Mikropartikeln
pPKC	phosphorilierte Proteinkinase C
PPR	engl. <i>pattern recognition receptors</i> , dt. Mustererkennungsrezeptoren
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTT	engl. <i>partial thromboplastin time</i> , dt. partielle Thromboplastinzeit
pZAP	phosphorylierte Version des ζ -assoziertes Protein von 70 kDa
Raf	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> [Fachbegriff]

RANTES	engl. <i>regulated and normal T-cell expressed and secreted</i> [Fachbegriff], dt. "reguliert und normal T-Zell-exprimiert und sezerniert"
Ras	engl. <i>rat sarcoma</i> [Fachbegriff]
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RGD-motif	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz [Fachbegriff]
RhoA	engl. <i>ras homolog gene family member A</i> , dt. Mitglied der ras-homologen Gen-Familie A
RNA	Ribonukleinsäure
Roryt	engl. <i>RAR-related orphan receptor gamma</i> [Fachbegriff], dt. RAR-verwandtes Orphan-Rezeptor-Gamma
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , dt. reaktive Sauerstoffspezies
RPM	engl. <i>rotations per minute</i> , dt. Umdrehungen pro Minute
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
sCD40L	engl. <i>soluble CD40</i> , dt. gelöstes CD40
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SLP-76	engl. <i>SH2-domain-containing leucocyte protein of 76 kDa</i> , dt. SH2-Domäne-enhaltendes Leukozytenprotein von 76kDA
Sos	engl. <i>son of sevenless</i> [Fachbegriff]
SRR	Serin-reicher Repeat
SSC	engl. <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TEG	Thromboelastografie
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor</i> , dt. transformierender Wachstumsfaktor
Th-2	Typ2 T-Helfer
TIC	engl. <i>trauma induced coagulopathy</i> , dt. traumainduzierte Koagulopathie
TIGIT	engl. <i>T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i> , dt. T-Zell Immunrezeptor mit Ig und ITIM Domäne
TIM-1	T-Zell-Immunglobulin Muzin 1
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TZR	T-Zell Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

VAV	[Fachbegriff], Protoonkogenprodukt
VCAM-1	engl. <i>vascular cell adhesion protein</i> , dt. Gefäßzelladhäsionsprotein 1
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> , dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZAP-70	ζ-assoziiertes Protein von 70 kDa

5 Einleitung

5.1 Die Relevanz der Trauma-Immunologie

5.1.1 Die gesellschaftliche Relevanz traumatischer Verletzungen

Traumatische Verletzungen stellen global ein bedeutendes Problem der öffentlichen Gesundheit dar. Jedes Jahr versterben weltweit 5,8 Millionen Menschen an den Folgen traumatischer Verletzungen, dies entspricht etwa 15.000 Personen pro Tag (World Health Organization 2010). Eine aktuell und in Bezug auf die Zukunft besonders gravierende Subgruppe stellen Verkehrsunfälle dar, die mit 23% zu den am häufigsten zum Tod führenden Gründen für traumatische Verletzungen zählen (World Health Organization 2010). Neben 50 Millionen nicht-tödlichen Verletzungen führen Verkehrsunfälle zu 1,35 Millionen Todesfällen pro Jahr und repräsentieren damit die führende weltweite Todesursache in der Altersgruppe von 5 - 25 Jahren (World Health Organization 2018). Laut einer Prognose der Weltgesundheitsorganisation werden Verkehrsunfälle im Jahr 2030 - bezogen auf alle Gesundheitsstörungen und Altersgruppen - die siebthäufigste Todesursache der Welt darstellen (World Health Organization 2018).

5.1.2 Spektrum, Verlauf und Therapiekonzepte bei traumatischen Verletzungen

Insbesondere Hochrasanztraumata wie Verkehrsunfälle resultieren a priori potentiell in diversen Kombinationen von Schädel-Hirn-Verletzungen, Rückenmarksverletzung, Bauch- und Beckentraumata (Markogiannakis, Sanidas et al. 2006) sowie Verbrennungsverletzungen (Papaevangelou, Batchelor et al. 1995). Nach der aktuellen Definition der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (Stand 04/2020) wird die Verletzung mehrerer Körperregionen oder Organsysteme, bei denen die einzelne oder die Kombination mehrerer Verletzungen für den Patienten lebensbedrohlich ist, als Polytrauma bezeichnet (Ina Aschenbrenner 2012). Bei fatalem Verlauf polytraumatischer Verletzungen zeigten intensivmedizinische Analysen drei Sterblichkeitsgipfel. Im Rahmen des Traumaereignis entstandene und nicht mit dem Leben vereinbare Verletzungen wie Schädel-Hirn-Traumata, atlanto-okzipitale Dislokation und penetrierende Verletzungen großer Gefäße repräsentieren den ersten Sterblichkeitsgipfel (Soforttod), während intrakranielle Blutungen und Sauerstoffmangel in Folge von Gasaustauschstörungen oder Hypovolämie einen zweiten Sterblichkeitsgipfel innerhalb von 24 Stunden bedingen (Baker, Oppenheimer et al. 1980, Acosta, Yang et al. 1998, Demetriades, Murray et al. 2004). Der dritte Sterblichkeitsgipfel, ca. 72 Stunden nach dem Initialereignis, wird durch u.a. immunologisch bedingtes Multiorganversagen

(MOV) im Rahmen der intensivstationären Behandlung verursacht (Brun-Buisson 2000, Demetriades, Murray et al. 2004). Insbesondere bezüglich der Spätgründe für Mortalität besteht erhebliches Potenzial zur Verbesserung der Therapiestrategien (Acosta, Yang et al. 1998, Demetriades, Murray et al. 2004).

5.1.3 Die immunologische Dysbalance nach traumatischen Verletzungen

Der traumatisch bedingte Gewebeschaden - verursacht durch Gewebehypoxie, Organschäden, Weichteilverletzungen, Frakturen, Infektionen, etc. (Wutzler, Lustenberger et al. 2013) - aktiviert das Immunsystem lokal und systemisch durch proinflammatorische Mediatoren (Lenz, Franklin et al. 2007).

Auf zellulärer Ebene werden, im Rahmen des entstandenen Gewebeschaden mit konsekutiver posttraumatischer Hyperinflammation, proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Hyperakut werden Faktoren wie der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- α und Interleukin(IL)-1 β sezerniert, gefolgt von weiteren inflammatorischen Mediatoren wie IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, MMF (macrophage migratory factor [Fachbegriff], dt. „Hemmfaktor für die Makrophagenmigration“), HMG-1 (engl. *high motility group protein-1*[Fachbegriff]) und IFN- γ (Interferon- γ) (Dinarello 2000, Giannoudis, Hildebrand et al. 2004, Keel and Trentz 2005, Lenz, Franklin et al. 2007). Zudem kommt es nach schwerem Trauma zu einer unspezifischen Aktivierung des Komplementsystems (Shatney and Benner 1985, Lenz, Franklin et al. 2007).

Primär getrieben durch das unspezifische Immunsystem wird zudem das zelluläre Verteidigungsnetzwerk des Organismus bestehend aus Monozyten, Gewebsmakrophagen, natürlichen Killerzellen, polymorphonukleären Leukozyten, parenchymalen Zellen und Lymphozyten auto- sowie parakrin aktiviert (van Griensven, Krettek et al. 2003, Keel and Trentz 2005).

In der frühen Phase der zellulären Immunantwort sind vor allem Zellen des unspezifischen Immunsystems von Bedeutung (Stoecklein, Osuka et al. 2012), z.B. die schnell aktivierbaren neutrophilen Granulozyten und die Makrophagen, die durch die zirkulierenden Mediatoren aktiviert und rekrutiert werden und wiederum selbst proinflammatorische Stoffe sezernieren (Keel and Trentz 2005, Lenz, Franklin et al. 2007).

Im Rahmen des Traumas kommt es zudem zur Freisetzung von DAMPs (engl. *damage associated molecular pattern*, dt. „schaden-assoziiertes molekulares Muster“). Diese sog. DAMPs werden bei endogenem Ursprung als Alarmine (= durch Zellschaden freigewordene Faktoren und Antigene), bei exogenem Ursprung als pathogen-assoziierte

molekulare Muster, sog. PAMPs (engl. *pathogen associated molecular patterns* dt. Pathogen assoziierte molekulare Muster), bezeichnet (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Endogene und exogene DAMPs werden durch die sog. Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*; PPR) der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) erkannt, zu denen funktionell u.a. dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten zählen. Über sog. Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle / MHC-II-Moleküle (engl. *major histocompatibility complex*, dt. Haupthistokompatibilitätskomplex) werden DAMPs den T-Lymphozyten präsentiert und von diesen erkannt (Flohe, Flohe et al. 2008, Zelenay and Reis e Sousa 2013). In Synergie mit inflammatorischen Zytokinen führen DAMPs so über eine Aktivierung der T-Lymphozyten zu einer Induktion des spezifischen Immunsystems. Zu diesen inflammatorischen zytokinbasierten Mechanismen zählt die indirekte Aktivierung durch TNF- α , IL-6 oder HMGB1, die zu gesteigerter Aktivität der APZ führen und die direkte Stimulation der T-Zellen über IL-1 α und IL-33 (Keel and Trentz 2005, Lenz, Franklin et al. 2007, Hirsiger, Simmen et al. 2012). Vor allem Th-1-Zellen - selbst durch IL-12 der APZ stimuliert - unterstützen die proinflammatorische Kaskade durch Sekretion von IL-2, INF- γ und TNF- β (Keel and Trentz 2005).

Die unkontrollierte systemische Aktivierung des Immunsystems kann in der Folge durch pathologische biophysiological Veränderungen wie eine erhöhte Endothel-Permeabilität, Endothel-Schäden und Dysfunktion der mikrovaskulären Zirkulation zu systemischen Schäden und schweren klinischen Komplikationen führen (Lenz, Franklin et al. 2007).

Klinisch korreliert der Grad der proinflammatorischen Immunantwort mit der Schwere der Verletzung gemessen an der Höhe des Injury Severity Scores (ISS), der Inzidenz eines Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom (engl. *multi-organ-dysfunction-syndrome*, MODS) und dem Outcome (Roumen, Hendriks et al. 1993, Keel and Trentz 2005, Lenz, Franklin et al. 2007).

5.1.4 Das systemische inflammatorische Response-Syndrom

Bei über 90% der Traumapatienten auf Intensivstation kann durch die überschießende posttraumatische Inflammation ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) diagnostiziert werden, welches mit der Spätmortalität nach Trauma assoziiert ist (Hoover, Bochicchio et al. 2006, Lenz, Franklin et al. 2007). Der Terminus SIRS beschreibt eine Kombination von klinischen Parameterveränderungen bei Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Blutbild und hat im Rahmen der

2016 revidierten dritten internationalen Konsensus-Definition für Sepsis (Sepsis-3) im septischen Kontext an klinischer Bedeutung verloren (Singer, Deutschman et al. 2016). Aktuell behält das Konzept des SIRS im klinischen Alltag im Hinblick auf die Folgen steriler inflammatorischer Prozesse wie Polytrauma jedoch weiterhin seine Relevanz. Nach dem von Moore et al. entwickelten „*two-hit-model*“ (dt. Zwei-Reiz-Modell), kann das SIRS sowohl direkt durch überschießende proinflammatorische Veränderungen, bedingt durch primäre Verletzungen (erster *Hit*; =dt. Reiz) im Rahmen des Trauma verursacht werden, als auch aus einer überschießenden Immunantwort auf sekundären Stress wie Infektion oder Ischämie-Reperfusionen (zweite *Hits*) resultieren. Abhängig von der Schwere des SIRS können diese Stimuli zu einem Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom/ MODS oder Multiorganversagen (MOV) führen (Moore and Moore 1995, Parke, Liu et al. 2003).

Der im Rahmen des ersten *Hit* entstehende „bahnende“ proinflammatorische Effekt eines Traumas auf das Immunsystem, der im Rahmen des Moorschen *two-hit-models* bei einem sekundären Stimulus zu einer überschießenden Inflammation führt, kann sich für den Organismus sowohl positiv - durch eine schnelle und effektive antimikrobielle Abwehr durch das unspezifische Immunsystem - als auch negativ durch die Komplikationen der Hyperinflammation auswirken (Stoecklein, Osuka et al. 2012).

5.1.5 Das kompensatorische antiinflammatorische Response-Syndrom

In dem protektiven Bestreben, die immunologische Balance zu gewährleisten, reagiert der Organismus auf die systemische Inflammation mit einer kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktion – dem 1996 erstbeschriebenen kompensatorischen antiinflammatorischen Response-Syndroms (engl. *compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS) (Bone 1996, Bone, Grodzin et al. 1997, Munford and Pugin 2001). Ein klinisches Scoring-System mit klar definierten Kriterien existiert nicht, es kommt jedoch im Rahmen der kompensatorischen antiinflammatorischen Immunantwort zu verschiedenen typischen messbaren Veränderungen. So reagiert das erworbene Immunsystem mit einer für das CARS typischen Dominanz der antiinflammatorischen Typ2-T-Helfer(Th-2)-Zellen über die inflammatorischen TH-1-Zellen und eine verminderte Aktivität der APZ (O'Sullivan, Lederer et al. 1995, Faist, Schinkel et al. 1996, Lederer, Rodrick et al. 1999, Keel and Trentz 2005). Im Rahmen der antiinflammatorischen Reaktion werden zudem erhöhte Serumspiegel von antiinflammatorischen Zytokinen wie u.a. IL-4, IL-10 und IL-13 und immunsuppressiven

Mediatoren wie Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickstoffmonoxid gemessen (Cox 1996, Bone, Grodzin et al. 1997, Alexander, Chaudry et al. 2002, Collighan, Giannoudis et al. 2004). Klinisch kann das CARS seinerseits durch immunsuppressive Bedingungen die Gefahr für Komplikationen wie sekundäre Infektionen erhöhen (Adib-Conquy and Cavaillon 2008, Stoecklein, Osuka et al. 2012). Hierbei korreliert die Höhe der Serumlevel antiinflammatorischer Mediatoren und die reduzierte APZ-Funktion mit posttraumatischen Komplikationen (Neidhardt, Keel et al. 1997, Hensler, Sauerland et al. 2002, Giannoudis, Hildebrand et al. 2004).

Entgegen dem früheren Verständnis einer inflammatorisch-antiinflammatorischen sequentiellen Abfolge nach traumatischem Stimulus zeigen Daten aus aktuellen Studien, dass die entgegengesetzten pro- und antiinflammatorischen Einflüsse gleichzeitig auf die immunologische Balance einwirken (Stoecklein, Osuka et al. 2012, Hotchkiss, Monneret et al. 2013). Diese konzertierte immunologische Reaktion kann im immunologischen Equilibrium protektiv wirken, bei überschießendem inflammatorischen oder antiinflammatorischen Phänotyp im Sinne eines SIRS und CARS jedoch zu pathologischen Komplikationen beitragen (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Eine schematische Darstellung der posttraumatischen immunologischen Phänotypen erfolgt in Abbildung 1.

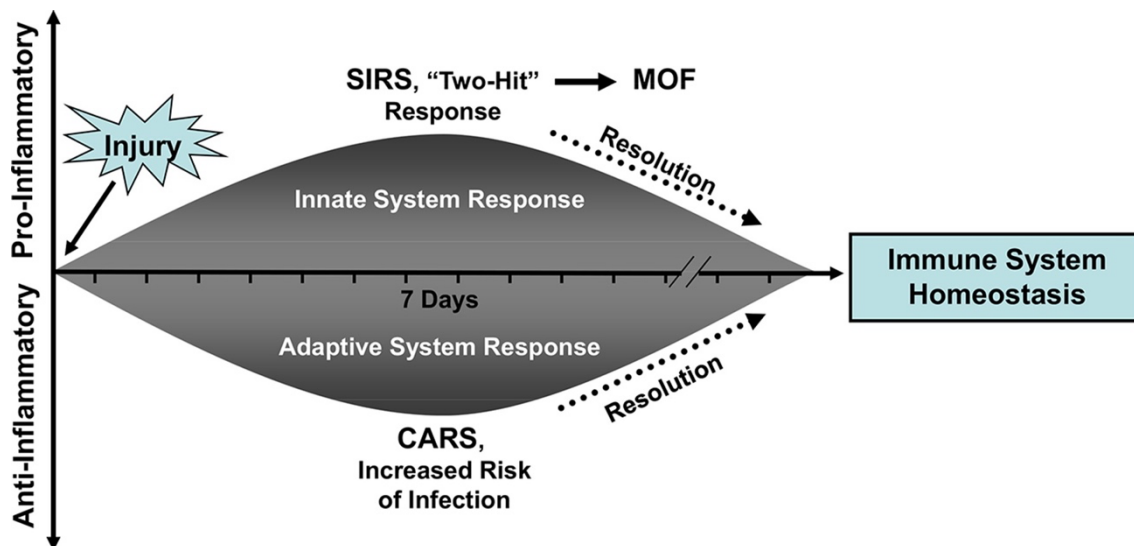


Abbildung 1 Traumatische Verletzungen resultieren in einer Dysbalance des Immunsystems

Dargestellt ist die Auswirkung einer traumatischen Verletzung auf die immunologische Balance. Durch die Verletzung als immunologischem Stimulus kann es phänotypisch als Konsequenz einer überschießenden inflammatorischen Reaktion des angeborenen Immunsystems zu einem SIRS (systemisches inflammatorisches Response Syndrom) oder als Konsequenz einer überschießenden antiinflammatorischen Reaktion des adaptiven Immunsystems zu einem CARS (kompensatorisches antiinflammatorisches Response-Syndroms) kommen. Im Rahmen eines erneuten immunologischen Stimulus im Rahmen eines „second hit“ kann es auf Basis der Immundysbalance zur schweren Komplikationen wie einem MOV (engl. multi-organ failure, dt. Multiorganversagen) kommen. Im Rahmen der Rekonvaleszenz kommt es bei opportunem klinischen Verlauf zu einer Wiederherstellung der

immunologischen Balance. [Reprinted by permission of John Wiley and Sons: Stoecklein, V.M., A. Osuka, and J.A. Lederer, Trauma equals danger--damage control by the immune system. J Leukoc Biol, 2012. 92(3): p. 539-51. copyright © 1999-2020 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. Permission number 4933531346693]

5.1.6 Die Rolle immunologischer Forschung in der Versorgung von Traumapatienten

Die Komplikationen dieser posttraumatischen Störung der immunologischen Homöostase gefährden die Patienten im Rahmen der Spätmortalität. Mechanismen dieser immunologischen Prozesse sind nicht eindeutig geklärt und diagnostische sowie therapeutische Maßnahmen bergen erhebliches Potential für Verbesserung (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Vor dem Hintergrund der erheblichen Einschränkung der Lebenserwartung der Patienten sowie der schwerwiegenden Beeinträchtigung durch Trauma, besteht die Notwendigkeit, eine optimale Versorgung polytraumatisierter Patienten zu gewährleisten. Eine evidenzbasierte Grundlage neuartiger therapeutischer Strategien ergibt sich aus den Erkenntnissen klinisch orientierter experimenteller Forschung zu den komplexen pathophysiologischen posttraumatischen Prozessen.

5.2 Wichtige Zelltypen nach Trauma

In den vielschichtigen posttraumatischen immunologischen Reaktionsketten nehmen zwei Zelltypen - regulatorische CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) und Thrombozyten - aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen auf das angeborene und erworbene Immunsystem ebenso wie posttraumatische Blutgerinnung eine wichtige Rolle ein, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

5.2.1 Regulatorische CD4⁺T-Zellen

5.2.1.1 Eine Charakterisierung des Zelltyps

Das Immunsystem als Verteidigungssystem des Organismus ist auf eine sensible Balance zwischen der Erkennung und Bekämpfung pathogener Strukturen sowie der Toleranz körpereigener Moleküle angewiesen. Eine Dysbalance äußert sich in einem hyperinflammatorischen, autoimmunaggressiven oder hypoinflammatorischen, für Infektionen anfälligen Phänotyp. Mechanismen, über die diese Fähigkeit zur Diskrimination zwischen körpereigenen und körperfremden sichergestellt wird, inkludieren die T-Zell-Selektion im Thymus. Über das zufällige Rearrangement der T-Zell-Rezeptor-Gene in diesem Prozess wird die Bildung antigen-erkennender aber gleichzeitig nicht-autoreaktiver T-Zellen sichergestellt (Kennedy 2010). Einen weiteren Mechanismus stellt die regulatorische Schaltfunktion des spezifischen Immunsystems durch einen

regulatorischen T-Helfer-Zell-Subtyp dar, die CD4⁺ Tregs (McCarville and Ayres 2018). Dieser periphere lokalisierte Mechanismus ist essentiell, da im Thymus nicht alle körpereigenen Antigene für T-Zell-Erziehung synthetisiert werden können und das Immunsystem in der Peripherie auch mit nicht-pathogenen, nützlichen körperfremden Antigenen der bakteriellen Haut- und Darmflora oder Lebensmittel konfrontiert wird (Agace and McCoy 2017). Zudem stellt dieses System einen peripheren Sicherheitsmechanismus zur Verhinderung überschießender Immunreaktionen dar.

Erstbeschrieben 1995 von Sakaguchi et al., nimmt dieser T-Helfer-Zell-Subtyp über antigenunspezifische Herabregulation der Immunantwort eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Verhinderung von autoimmunen Prozessen ein (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Sakaguchi et al. stellten in einem Depletionsmodell 1995 erstmals fest, dass die Expression der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors auf einem Subtyp der CD4⁺T-Zellen essentiell für die immunologische Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems und damit die immunologische Balance ist (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Konsekutiv beschrieb man den entdeckten regulatorischen Zelltyp initial über die Expression des primär als typisch identifizierten CD25 zusammen mit dem T-Helfer-Zell Oberflächenprotein CD4. Spätere Studien ergaben jedoch, dass die Expression von CD25 zwar sensitiv, jedoch nicht spezifisch für den regulatorischen T-Helfer-Subtyp ist (Letourneau, Krieg et al. 2009). 2001 wurde in einer Studie gezeigt, dass eine Mutation in dem Gen für den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein-3 (FoxP3) verantwortlich für das Immundysregulationssyndrom IPEX (Akronym: Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal) ist (Bennett, Christie et al. 2001). Daraufhin wurde ab 2003 in mehreren Arbeiten beobachtet, dass der regulatorische T-Helfer-Zell-Subtyp relativ spezifisch über den Transkriptionsfaktor FoxP3 identifiziert werden kann, welcher CD4⁺ Treg-spezifisch exprimiert wird und sowohl für die CD4⁺ Treg-Differenzierung als auch CD4⁺ Treg-Funktion eine wichtige Rolle spielt (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003). Der Anteil der FoxP3-positiven CD4⁺ Tregs an der CD4⁺ T-Zell-Population in Menschen und Mäusen beträgt ca. 10% (Hanschen, Tajima et al. 2012) und sie sind - unabhängig vom inflammatorischen Status des Organismus - ubiquitär im lymphatischen sowie nicht-lymphatischen Gewebe angesiedelt (Sather, Treuting et al. 2007, Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Weitere Studien zeigten, dass - basierend auf deren Ursprung - innerhalb der CD4⁺ Treg-Population zwischen thymisch generierten „natürlichen“ CD4⁺ Tregs (engl. *natural CD4⁺ Tregs*, nCD4⁺ Tregs) und peripher „induzierten“ CD4⁺ Tregs (engl.

inducible CD4⁺ Tregs, *iCD4⁺ Tregs*) unterschieden werden kann (Belkaid and Oldenhove 2008, Schmetterer, Neunkirchner et al. 2012, Kraj and Ignatowicz 2018). Zudem wurde gezeigt, dass auch andere Zelltypen, u.a. CD8⁺T-Zellen und B-Zellen, FoxP3 exprimieren und über regulatorische Kompetenzen verfügen (Zhang, Kong et al. 2014). Funktionell können die CD4⁺ Tregs im Menschen über CD45RA, in der Maus über den Aktivierungsmarker CD44, den Chemokinrezeptor CCR7 und den Homing-Rezeptor L-Selektin unterschieden werden. Über diese Marker werden sie jeweils in differenziert agierende *resting Tregs* (dt. ruhende Tregs), auch bezeichnet als *central Tregs* (dt. zentrale Tregs, c Tregs), und *activated Tregs* (dt. aktivierte Tregs), auch bezeichnet als *effector Tregs* (dt. Effektor- Tregs, e Tregs), unterteilt (Campbell 2015, Li and Rudensky 2016). Diese Subpopulationen agieren funktionell unterschiedlich. Die c Treg-Subpopulation zirkuliert im sekundär lymphatischen Gewebe und inhibiert die immunologische Bahnung der nicht-regulatorischen CD4⁺T-Effektorzellen. Die eTregs agieren relativ ortsgebunden im nicht-lymphatischen und inflammatorisch veränderten Gewebe und schwächen die CD4⁺T-Effektorzellantwort ab (Yamaguchi, Wing et al. 2011, Cretney, Kallies et al. 2013, Campbell 2015). Ein zusätzlicher Subtyp - die memory Tregs (m-Tregs) - werden bei transientem Antigenkontakt gebildet und persistieren auch ohne fortgesetzte antigeninduzierte Stimulation (Rosenblum, Gratz et al. 2011). Die Definitionen der Subpopulationen regulatorischer Zellen sind nicht abschließend festgelegt (Abbas, Benoist et al. 2013); die in dieser Arbeit untersuchte Population wurde über CD4-Positivität und FoxP3-Positivität identifiziert.

Im Vergleich zu konventionellen T-Helfer-Effektorzellen (CD4⁺ non-Tregs), sind verschiedene zelluläre Signalprozesse in CD4⁺ Tregs verändert, wie z.B. die fehlende Fähigkeit die Proteinkinase-B (Crellin, Garcia et al. 2007) und die Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC γ 1) zu phosphorylieren (Hickman, Yang et al. 2006) - ebenso wie ein Defekt in T-Zell-Rezeptor (TZR)-Signalwegen wie dem Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg (Crellin, Garcia et al. 2007) und dem *Ras-MAPK* (engl. *mitogen activated protein kinase*, dt. mitogenaktivierte Proteinkinase)-Signalweg (Li, Godfrey et al. 2005, Tsang, Camara et al. 2006). Zudem verfügen die CD4⁺ Tregs - mit einer konstitutiven Expression von IL-Rezeptoren (CD25 und CD122) (Setoguchi, Hori et al. 2005), ATP-konvertierenden Enzymen (CD39 und CD73) und dem veränderten Expressionsverhalten des Hyaluron-bindenden CD44 (Firan, Dhillon et al. 2006) - über ein breiteres Rezeptor-Portfolio. Die, im Vergleich zu konventionellen T-Helfer-Zellen, veränderte Funktionalität zeigt sich in einer höheren metabolischen Aktivität, einer

höheren Sensitivität, einer schnelleren Antwort auf externe Stimuli, sowie einer, im Gegensatz zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen, nicht-proliferativen Reaktion auf TZR-Stimulation (Matarese, De Rosa et al. 2008).

5.2.1.2 Die immunologische Steuerung der CD4⁺ regulatorischen T-Zelle

Die CD4⁺ Tregs selbst unterliegen verschiedenen Regulationsmechanismen, die sowohl zytokin-basiert als auch TZR-abhängig Aktivierung und Funktion regulieren.

Zytokin-basiert wird die Entwicklung, Differenzierung, homöostatische Aktivität und Funktion der CD4⁺ Tregs beispielsweise in einer zytokin-abhängigen Interaktion mit CD4⁺ FoxP3⁻ T-Effektorzellen über eine kontinuierliche IL-2-abhängige Feedbackschleife reguliert (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002, Malek, Yu et al. 2002, Bensinger, Walsh et al. 2004, Fontenot, Rasmussen et al. 2005, Setoguchi, Hori et al. 2005, Benoist and Mathis 2012). Über diesen Mechanismus ist die Proliferation von CD4⁺ Tregs direkt abhängig vom Grad der Aktivierung der T-Effektorzellen und in immunologischer Homöostase wird so ein Gleichgewicht sichergestellt (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002, Malek, Yu et al. 2002, Bensinger, Walsh et al. 2004, Fontenot, Rasmussen et al. 2005, Setoguchi, Hori et al. 2005, Benoist and Mathis 2012). Des Weiteren ist ein TGF-β-abhängiger Regulationsmechanismus beschrieben. Im Mausmodell wurde auch eine Regulation der thymischen Entwicklung der CD4⁺ Treg über TGF-β beobachtet; zusätzlich wurde sowohl im murinen als auch humanen Modell gezeigt, dass TGF-β fördernd auf die periphere Entwicklung der CD4⁺ Tregs wirkt (Chen, Jin et al. 2003, Amarnath, Dong et al. 2007, Liu, Zhang et al. 2008). Auch Interleukin-abhängige Regulationsmechanismen sind beschrieben; so wirken IL-15 und IL-7 aktivierend in Entwicklung und Homöostase der CD4⁺ Tregs (Burchill, Yang et al. 2007, Bayer, Lee et al. 2008, Gratz, Truong et al. 2013, Raynor, Sholl et al. 2013). TNFα zeigt in humanen und murinen Studien einen hemmenden Effekt auf die CD4⁺ Treg-Funktion und wirkt im Mausmodell einer peripheren Differenzierung der CD4⁺ Tregs entgegen (Wang, van Dongen et al. 2008, Nie, Zheng et al. 2013, Zhang, Cui et al. 2013). Eine komprehensiv Übersicht der Rolle der verschiedenen Zytokine in der Steuerung der CD4⁺ Tregs wurde u.a. 2015 publiziert (Hoeppli, Wu et al. 2015).

Auch TZR-abhängige Regulationsmechanismen sind beschrieben. Humane und murine in-vitro Studien zeigen, dass CD4⁺ Tregs - ähnlich wie konventionelle CD4⁺ T-Zellen - auch TZR-abhängig aktiviert werden (Baecher-Allan, Brown et al. 2001, Levings,

Sangregorio et al. 2001, Taams, Vukmanovic-Stejic et al. 2002, Sakaguchi, Miyara et al. 2010). Auch funktionell scheinen CD4⁺ Tregs abhängig von einer TZR-Stimulation zu sein. So zeigten Studien von Levine et al. sowie Vahl et al., dass die suppressive Kapazität der CD4⁺ Tregs TZR-abhängig ist (Levine, Arvey et al. 2014, Vahl, Drees et al. 2014). Eine TZR-Abhängigkeit der suppressiven Kapazität der CD4⁺ Tregs abhängig von der Interaktion mit APZ wurde in-vitro von Onishi et al. beobachtet (Onishi, Fehervari et al. 2008). Auf Basis dieser Studien etabliert sich ein Konsens, dass TZR-Signale die suppressive Funktion der CD4⁺ Tregs über Genexpression, Zellmetabolismus und Zelladhäsion beeinflussen können (Li and Rudensky 2016). Trotz dieser Ergebnisse scheint die TZR-vermittelte Stimulation jedoch nicht der alleinige Regulationsmechanismus zu sein. So zeigte eine murine Studie von Szymczak-Workman et al., dass CD4⁺ Tregs sowohl TZR- als auch APZ-unabhängig aktiviert werden können (Szymczak-Workman, Workman et al. 2009). Konsekutive Arbeiten beschrieben, dass zumindest die Grundstoffwechselaktivität der CD4⁺ Tregs TZR-unabhängig ist (Levine, Arvey et al. 2014, Vahl, Drees et al. 2014). Inwieweit eine TZR-Stimulation demnach absolut notwendig für den Aktivierungsprozess der CD4⁺ Treg ist, oder lediglich einen von mehreren möglichen Mechanismen repräsentiert, wird in der Literatur weiterhin kritisch diskutiert.

5.2.1.3 Die immunsuppressive Funktion der CD4⁺ regulatorischen T-Zelle

Ihren regulatorischen Effekt auf das Immunsystem zur Erhaltung der Immunbalance des Organismus üben CD4⁺ Tregs durch immunsuppressives Signalverhalten auf die nicht-regulatorischen CD4⁺T-Effektorzellen des adaptiven Immunsystems aus. Zum einen beeinflussen CD4⁺ Tregs die CD4⁺T-Effektorzellen parakrin über antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF-β (engl. *transforming growth factor*; dt. transformierender Wachstumsfaktor) (Nakamura, Kitani et al. 2004, Zhang, Koldzic et al. 2004, Sakaguchi, Wing et al. 2009). Zum anderen hemmen sie die proinflammatorische T-Effektorfunktion über direkten Zellkontakt mit einer direkten Beeinflussung der metabolischen Funktion von CD4⁺T-Effektorzellen via CD39/73 oder dem IL-2-Rezeptor CD25 (Sakaguchi, Wing et al. 2009, Josefowicz, Lu et al. 2012). Des Weiteren wird eine Herunterregulation der CD4⁺T-Effektorzellen via CD25 im Sinne einer negativen Feedback-Schleife ermöglicht. CD4⁺ Tregs - selbst stimuliert durch IL-2 - hemmen T-Effektorzellen über das für deren Proliferation wichtige, autokrin sezernierte

IL-2 kompetitiv, indem $CD4^+$ Tregs einen IL-2-Rezeptor exprimieren und IL-2 ligieren (Setoguchi, Hori et al. 2005, Vignali, Collison et al. 2008, Shevach 2009, Boyman and Sprent 2012, Campbell 2015). Durch die damit einhergehende Suppression der proinflammatorischen T-Effektor-Zellen wird ein immunsuppressiver Effekt erzielt.

Zusätzlich modifizieren $CD4^+$ Tregs die Funktion der - für die T-Effektor-Zellfunktion essentiellen - APZ. Diese Regulation wird beispielsweise über konstitutive Expression von CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; dt. zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein) erreicht, welches über eine Interaktion mit CD80/86 auf dendritischen Zellen eine aktivierende Kostimulation von T-Effektorzellen über CD28 verhindert (Read, Malmstrom et al. 2000, Onishi, Fehervari et al. 2008, Wing, Onishi et al. 2008, Shevach 2009). Weitere APZ-modifizierende Mechanismen der $CD4^+$ Tregs wurden über die Expression weiterer Oberflächenmoleküle mit eigenen nachgeschalteten Reaktionswegen beobachtet, beispielsweise Lymphozyten-aktivierende-Gen-3 (LAG3), TIGIT (engl. *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*, dt. T-Zell Immunrezeptor mit Ig und ITIM Domäne) und Neurolipin-1 (Liang, Workman et al. 2008, Sarris, Andersen et al. 2008, Yu, Harden et al. 2009, Josefowicz, Lu et al. 2012). Auch parakrine aktive Regulationsmechanismen der $CD4^+$ Tregs zur Einflussnahme auf T-Effektor-Zellen wurden 2004 erstmals beobachtet; so sind $CD4^+$ Tregs in der Lage, eine Zytolyse der T-Effektor-Zellen durch die Degranulation zytotoxischer Granula mit den proapoptischen Substanzen Perforin und Granzym B zu induzieren (Grossman, Verbsky et al. 2004, Gondek, Lu et al. 2005).

Trotz intensiver Forschungsaktivität sind die Mechanismen der $CD4^+$ Treg-medierten Immunsuppression zum aktuellen Zeitpunkt bis dato nicht abschließend geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Studien.

5.2.1.4 Die posttraumatische Rolle der $CD4^+$ regulatorischen T-Zelle

Auch im Kontext der traumatisch bedingten Immundysbalance nehmen $CD4^+$ Tregs eine Schlüsselrolle ein (Murphy, Choileain et al. 2005). Diese Einschätzung basiert auf Arbeiten, die zeigten, dass $CD4^+$ Tregs durch Trauma aktiviert werden (Choileain, MacConmara et al. 2005, Hanschen, Tajima et al. 2011, Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018). Posttraumatisch supprimieren $CD4^+$ Tregs die überschießende proinflammatorische $CD4^+$ T-Effektorzell-Aktivität und wirken so einer systemischen Hyperinflammation entgegen (Murphy, Choileain et al. 2005). Eine murine

Studie von Choileain und Koautoren konnte durch einen Vergleich von CD4⁺ Tregs traumatisierter gegen nicht-traumatisierte Mäuse zeigen, dass diese - posttraumatisch als protektiv angesehene - immunsuppressive Funktion der CD4⁺ Tregs nach Trauma verstärkt ist (Choileain, MacConmara et al. 2005). In dieser Arbeit konnte neben der Beobachtung einer verbesserten immunsuppressiven Effektorfunktion zudem gezeigt werden, dass die CD4⁺ Treg-Funktion - gemessen an der Expression kostimulatorischer Molekülen wie CD28, ICOS (engl. *Inducible T-cell COStimulator*, dt. induzierbarer T-Zell Kostimulator), CTLA-4 und PD-1 (engl. *programmed cell death protein 1*, dt. programmiertes Zelltod-Protein 1), die für Funktion und Überleben der CD4⁺ Tregs wichtig sind - posttraumatisch heraufreguliert ist (Choileain, MacConmara et al. 2005). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen bei CD4⁺ Tregs kommt es bei CD4⁺ FoxP3- T-Effektor-Zellen, nicht zu einer Aktivierung oder heraufregulierten Expression von kostimulatorischen Molekülen (Hanschen, Tajima et al. 2011, Stoecklein, Osuka et al. 2012). Auch in humanen Studien zu Hyperinflammation (in Trauma und Sepsis) konnten die posttraumatischen Veränderungen in der CD4⁺ Treg-Biologie beobachtet werden (Venet, Pachot et al. 2004, Guignant, Lepape et al. 2011).

Der molekulare Ablauf der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivierung ist von essentieller Relevanz im Verständnis posttraumatischer immunologischer Reaktionen. Derzeitige Konzepte der CD4⁺ Treg-Aktivierung gehen von einer T-Zell-Rezeptor-abhängigen Aktivierung durch die traumabedingte Ausschüttung von DAMPs aus. Es wird angenommen, dass DAMPs CD4⁺ Tregs direkt oder durch Präsentation auf APZ aktivieren können (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Dieses Konzept wurde in einer Zusammenschau der Erkenntnisse verschiedener Studien entwickelt. In einem von MacConmara und Mitarbeitern untersuchten murinen Verletzungsmodell konnte über einen adoptiven Transfer von DO-11 TZR-transgenen Zellen gezeigt werden, dass CD4⁺ Treg depletiertere Versuchstiere sowohl eine deutlich verbesserte antigenspezifische Typ2-T-Helferzell-basierte Expansion der CD4⁺T-Effektor-Zellen als auch eine verbesserte Typ1-T-Helferzell-Reaktivität aufwiesen (MacConmara, Tajima et al. 2011). Zusätzlich konnte die Studie zeigen, dass APZs CD4⁺ Treg-depletierter Versuchstiere signifikant höhere antigenpräsentierende Aktivität zeigten als APZ von Wildtypieren, sodass hypothetisiert wurde, dass CD4⁺ Tregs die CD4⁺ T-Effektor-Zellaktivität TZR-abhängig über die Kontrolle der APZ regulieren (MacConmara, Tajima et al. 2011). Eine konsekutive mechanistische murine Studie von Hanschen und Mitarbeitern zeigte, dass

eine TZR-abhängige Signaltransduktion früh nach einem Verbrennungstrauma in CD4⁺ Tregs beobachtet werden kann (Hanschen, Tajima et al. 2011). Obwohl diese Ergebnisse Einblick in die posttraumatische CD4⁺ Treg-Biologie bieten, sind die genauen Mechanismen, über die CD4⁺ Tregs posttraumatisch aktiviert werden, zum aktuellen Zeitpunkt noch unzureichend geklärt.

Die Konsequenz der CD4⁺ Treg-Aktivierung nach Trauma ist ebenfalls nicht abschließend untersucht; in der Literatur wird die Rolle aktivierter CD4⁺ Tregs im Rahmen des zwei-hit-Modells nach Trauma zum aktuellen Zeitpunkt als protektiv angesehen (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Diese Einschätzung basiert auf den Ergebnissen verschiedener Arbeiten zur posttraumatischen Funktion der CD4⁺ Tregs. Zang et al. demonstrierten eine Abhängigkeit der Mortalität von der Präsenz der CD4⁺ Tregs in einem murinen Verbrennungsmodell. In dieser Arbeit führte eine erhöhte T-Effektor-Zellaktivierung durch bakterielles Superantigen früh nach Trauma zu einer erhöhten Mortalität (Zang, Dolan et al. 2004). Im Gegensatz dazu führte derselbe inflammatorische Stimulus durch bakterielles Antigen eine Woche nach Trauma - einem Zeitraum in dem die CD4⁺ Treg-Zahl erhöht ist - nicht zu einer erhöhten Mortalität (Zang, Dolan et al. 2004). Diese Beobachtung einer posttraumatischen Erhöhung der CD4⁺ Tregs assoziiert mit erhöhter immunsuppressiver Funktion konnte auch in Studien mit Traumapatienten für den Menschen bestätigt werden (MacConmara, Maung et al. 2006). Es konnte zudem in einer murinen Verbrennungsstudie gezeigt werden, dass die Mortalität nach Entzündungsinduktion mittels LPS in starker Abhängigkeit von protektiv wirkenden CD4⁺ Tregs steht, deren Anwesenheit die Mortalität in diesem Modell um 50% senken kann (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Daraufhin postulierten Stoecklein et al. in einer Übersichtsarbeit eine protektive Rolle nach Trauma und hypothesisierten, dass die interindividuell verschiedene CD4⁺ Treg-Anzahl zu Unterschieden im Ausmaß posttraumatischer immunologischer Komplikationen führen könnte (Stoecklein, Osuka et al. 2012).

5.2.2 Thrombozyten

5.2.2.1 Thrombozyten in der Hämostase

Circa $75 - 200 \times 10^{10}$ Thrombozyten zirkulieren zu jeder Zeit durch den Blutstrom gesunder Menschen (Daly 2011). Es existiert ein solider Konsensus in der Literatur zur Funktion der Thrombozyten als zellulärer Bestandteil der Blutgerinnung im engen

Zusammenspiel mit den humoralen Gerinnungsfaktoren. Im Rahmen der primären Hämostase heften sich die Thrombozyten mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors (vWF) an den Endotheldefekt, sezernieren prokoagulatorische Faktoren und aggregieren durch eine Vernetzung mit Fibrinogenmolekülen. In der sekundären Hämostase (= Gerinnungskaskade) werden als Gerinnungsfaktoren bezeichnete Plasmaproteine über zwei proteolytische Spaltungskaskaden - bezeichnet als extrinsischer und intrinsischer Weg - im dreidimensionalen Thrombozytenpolymer aktiviert. In der gemeinsamen Endstrecke spaltet die Serinprotease Thrombin das in der primären Hämostase vernetzte Fibrinogen zu Fibrin und stabilisiert die aggregierten Thrombozyten im Thrombus.

Die hämostatische Funktion der Thrombozyten wird u.a. durch extrazelluläre Bindegewebsproteine wie Kollagen und den vWF sowie parakrin u.a. durch Thrombin, ADP, Thromboxan A₂ aktiviert. Nach Aktivierung degranulieren Thrombozyten und setzen ihrerseits vasoaktive thrombozytenaktivierende Substanzen wie ADP, Thromboxan A₂ in einer positiven Feedback-Schleife frei. Zu den hämostatisch bedeutenden Rezeptoren gehören das Thrombozytenmembranprotein Glykoprotein Ib (GpIb) (für vWF), Glykoprotein VI [GPVI] und $\alpha 2\beta 1$ als direkte Rezeptoren für Kollagen und der Fibrinogenrezeptor GpIIb/IIIa. Die Thrombozyten verfügen über verschiedene Granula, u.a. α -Granula, δ -Granula (engl. *dense granules*) und λ -Granula (Lysosomen), deren - nach derzeitigem Stand der Forschung ca. 4000 - bekannten Inhaltsstoffe auf Stimulation in den Blutstrom degranuliert werden (Herter, Rossaint et al. 2014). Zu den für Blutgerinnung und Wundheilung relevanten Substanzen gehören unter anderem vasoaktive (u.a. Serotonin), hämostatische (u.a. vWF, Fibrinogen, Faktor V, Faktor VIII, Fibronectin $\alpha 2$ -Antiplasmin, ADP, Ca^{2+}) und angiogenetische Substanzen und Faktoren, u.a. PDGF (engl. *platelet derived growth factor*, dt. Wachstumsfaktor aus Thrombozyten), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*, dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), FGF (engl. *fibroblast growth factor*, dt. fibroblastischer Wachstumsfaktor), TGF- β , etc. (Herter, Rossaint et al. 2014). In der aktuellen Literatur wird zunehmend das erst seit vergleichsweise Kurzem besser bekannte immunologische Potenzial der Thrombozyten untersucht (Elzey, Sprague et al. 2005).

5.2.2.2 Thrombozyten in der Immunologie

Nach der Entdeckung des immunologisch relevanten Rezeptor CD40-Ligand (CD40L) auf der Thrombozytenmembran wurde 1998 erstmals eine immunologische Funktion von Thrombozyten postuliert (Henn, Slupsky et al. 1998). Heute ist bekannt, dass Thrombozyten wichtige Elemente der unspezifischen als auch der erworbenen

Immunabwehr sind und mit fast allen bekannten Immunzellen interagieren können (Herter, Rossaint et al. 2014).

Zu den immunologischen Fähigkeiten der Thrombozyten zählen proinflammatorische Signalwirkung, Pathogenerkennung und parakrine sowie zellkontakt-vermittelte immunoaktive Mechanismen, über die Thrombozyten z.T. überschneidend Einfluss auf das erworbene und unspezifische Immunsystem nehmen (Engelmann and Massberg 2013).

5.2.2.2.1 Der Einfluss von Thrombozyten auf das unspezifische Immunsystem

Über pathogenabhängige immunologische Abwehrmechanismen können Thrombozyten mit Bakterien über klassisch hämostatische Rezeptoren wie GPIb (vWF-Rezeptor), über Serin-reiche Repeat (SRR) Proteine und das Integrin GPIIb/IIIa mit RGD-motif-ähnlichen (RGD-motif [Fachbegriff] = Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz) Proteinen auf der Bakterienoberfläche interagieren (Deppermann and Kubes 2016). Es ist des Weiteren bekannt, dass Thrombozyten über sog. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) verfügen, die eine Pathogenerkennung ermöglichen und so v.a. auf die unspezifische Immunabwehr Einfluss nehmen (Clark, Ma et al. 2007). Diese TLRs sind evolutionär entwickelte Mustererkennungsrezeptoren und können typische bakterielle Moleküle wie die bakteriellen Zellwandbestandteile Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharide (LPS) und Peptidoglykane erkennen, die in ihrer Gesamtheit als PAMPs (siehe oben) bezeichnet werden (Kawai and Akira 2010). Thrombozyten verfügen u.a. über TLR2, TLR4 und TLR9 (Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013). Verschiedene Studien zeigten, dass Thrombozyten im Rahmen von Immunabwehrprozessen in abhängig von der Expression ihrer TLR auf verschiedene Pathogen-Liganden funktionell differenziert reagieren können. Diese selektive Reaktivität wird u.a. durch jeweils verschiedene TLR-Signale und Zytokinsekretion mediiert (Shashkin, Brown et al. 2008, Rex, Beaulieu et al. 2009, Berthet, Damien et al. 2012). Über die Stimulation von TLR2 lösen verschiedene PAMPs eine Thrombozytenaggregation aus, welche in einer Degranulation der thrombozytären elektronendichten Granula und konsekutiver Aggregatbildung mit neutrophilen Granulozyten resultiert (Blair, Rex et al. 2009, Keane, Tilley et al. 2010). Über die Stimulation von TLR4 kommt es zu einer erhöhten Bindungskapazität der Thrombozyten an Fibrinogen, einer konsekutiven Ausschüttung der thrombozytären Granula und im septischen Kontext zu einer Bindung der Thrombozyten an neutrophile Granulozyten (Andonegui, Kerfoot et al. 2005, Clark, Ma et al. 2007, Zhang, Han et al. 2009). Über diese TLR-abhängige Interaktion mit neutrophilen Granulozyten können die Thrombozyten die Bildung eines extrazellulären Fasernetzwerks induzieren. In diesen

sog. NETs (engl. *neutrophil extracellular traps*, dt. neutrophile extrazelluläre Fallen) - bestehend aus neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, eingebettet in ein extrazelluläres Chromatin-Netzwerk - können Bakterien eingefangen und Immunzellen bei Entzündung zu einem frühen Zeitpunkt effektiv rekrutiert werden (Clark, Ma et al. 2007, Caudrillier, Kessenbrock et al. 2012).

Auch zytokinbasiert können Thrombozyten inflammatorisch auf das Immunsystem einwirken. Unter den - nach derzeitigem Stand der Forschung ca. 4000 bekannten - Inhaltsstoffen der Granula der Thrombozyten befindet sich eine Vielzahl immunologisch aktiver Substanzen (exemplarische Übersicht der Inhaltsstoffe der α -Granula in Tabelle 1) (Elzey, Sprague et al. 2005, Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013).

Tabelle 1 Übersicht der Inhaltsstoff der α -Granula

Selected biologically active components of platelets, which are released or synthesized upon activation	
Factor	Function
CD62P (P-Selectin)	Procoagulant, recruitment of SMC and leukocytes
CD41/62 (GP IIb/IIIa)	Promotes interaction with other cell types
ICAM-2	Possible role in leukocyte interaction
IL-1 β	Regulates activity of leukocyte subsets and endothelial cells
HMGB1	Regulates activity of leukocyte subsets and endothelial cells
CXCL7	PMN recruitment
β -TG	PMN recruitment
PF4 (CXCL4)	PMN recruitment
GRO- α (CXCL1)	PMN recruitment
ENA-78 (CXCL5)	PMN recruitment
IL-8 (CXCL8)	PMN, T cell, basophil recruitment
RANTES (CCL5)	Recruits and modulates activity of various leukocyte and lymphocyte subsets
MIP-1 α (CCL3)	Recruits leukocytes and NK cells
MCP-3 (CCL7)	Recruits leukocytes and NK cells
Histamine	Modulator of endothelial cells, leukocytes, and lymphocytes
Serotonin	Modulates monocytes and macrophages
IL-7	Immune modulation
TXA ₂	Procoagulant, modulates T cell and leukocytes subsets
PAF	Procoagulant, modulates leukocyte and lymphocyte subsets
CD154 (CD40L)	Modulates various leukocyte and lymphocyte subsets
12-HETE	Chemotactic
PDGF	Angiogenesis, regulates growth, division, and migration of numerous cell types
TGF- β	Immune modulator, chemoattractant to leukocytes, regulates leukocyte and lymphocyte activity
Thrombocidins	Microbicidal
FasL (CD95L)	Induces apoptosis, PMN recruitment
TRAIL (Apo2L)	Induces apoptosis
EGF	Promotes growth of endothelium, angiogenesis
Angiopoietin	Angiogenesis
FGF	Promotes growth of fibroblasts, angiogenesis
PGE2	Vasodilation
PGD2	Vasodilation

Übersicht über die immunologisch aktiven Substanzen in den α -Granula der Thrombozyten. Reprinted from Elzey, B.D., D.L. Sprague, and T.L. Ratliff, The emerging role of platelets in adaptive immunity. Cell Immunol, 2005. 238(1): p. 1-9, Copyright © 2005 Elsevier Inc. with permission from Elsevier; permission number 4933561038815.

Bestandteil der thrombozytären Granula sind immunologische Agenzien wie Chemokine (CXCL4= Plättchenfaktor 4 (PF-4), MIP-1 α (engl. *macrophage inflammatory protein-1 α*

[Fachbegriff], dt. entzündliches Makrophagenprotein-1 α), CCL4, CCL5=RANTES, CCL7, CCL17, IL-8, etc.), Zytokine (HMGB1, IL-1- α , IL-1- β , IL-7, sCD40L, sCD62P, etc.), Proteaseinhibitoren (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, etc.) sowie transportfähige Rezeptoren (P-Selektin, GPIIb/IIIa, GP1b α) (Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013, Duerschmied, Bode et al. 2014). Zudem wurde beobachtet, dass klassisch hämostatische thrombozytäre Aktivierungsstoffe wie Thrombin, ADP und Thromboxan A₂ auch in immunologischen Prozessen wie Entzündungen als Schlüsselregulatoren wirken (Ma and Dorling 2012, Liverani, Kilpatrick et al. 2014). Über diese verschiedenen immunologisch aktiven Substanzen üben Thrombozyten verschiedene Einflüsse auf das spezifische und unspezifische Immunsystem aus (Übersicht siehe Tabelle 1).

Über den frei zirkulierenden Rezeptors sCD40L (engl. *soluble CD40 ligand*, dt. gelöster CD40-Ligand), dessen Hauptproduzent Thrombozyten sind, wird die Produktion von Radikalen wie der reaktiven Sauerstoffspezies ROS (engl. *reactive oxygen species*) induziert (Rondina, Weyrich et al. 2013, McFadyen and Kaplan 2015). Über das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) stimulieren Thrombozyten die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an das Endothel, bewirken eine Makrophagenaktivierung und wirken aktivierend auf dendritische Zellen, zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen (Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013, Rondina, Weyrich et al. 2013, McFadyen and Kaplan 2015). Über das Chemokin MIP-1 α können Thrombozyten chemotaktisch Lymphozyten, Makrophagen, eosinophile und basophile Granulozyten sowie natürliche Killerzellen und dendritische Zellen rekrutieren (McDermott and Murphy 2000, Duerschmied, Bode et al. 2014). Über das granulär gespeicherte Chemokin RANTES/CCL5 können Thrombozyten sowohl Monozyten, eosinophile Granulozyten als auch T-Zellen effektiv rekrutieren und so inflammatorische Prozesse verstärken (Levy 2009). Über das granulär sezernierte PF-4/CXCL-4 üben Thrombozyten chemotaktischen Einfluss auf Makrophagen und Neutrophile aus, stimulieren die Stoffwechselaktivität der Makrophagen, verstärken die Adhäsionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten, stimulieren T-Zell-Aktivierung und -Proliferation und steigern die CD4⁺ Treg-Proliferation (Petersen, Bock et al. 1999, Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013). Thrombozyten agieren auch über direkten Zellkontakt; sie spielen z.B. eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten in entzündlichen Prozessen über adhäsionsmolekül-gesteuerte Interaktion mit dem Endothel (beispielsweise über membranständiges P-Selektin) und konsekutive selbstverstärkende Rückkopplung (Herter, Rossaint et al. 2014). In einem weiteren Mechanismus können

Thrombozyten nicht nur vorgefertigte, sondern kontextspezifisch auch neu synthetisierte Proteine sowie messenger-RNA und micro-RNA sezernieren (Herter, Rossaint et al. 2014).

5.2.2.2.2 Der Einfluss von Thrombozyten auf das erworbene Immunsystem

Über verschiedene Mechanismen können Thrombozyten auch das spezifische Immunsystem modifizieren. Thrombozyten beeinflussen die zelluläre Komponente des spezifischen Immunsystems über die Rekrutierung, die Aktivierung, das *Homing* (= Zirkulationsprozess der Lymphozyten) und die Modulation der dendritischen Zellen, B- und T-Zellen, sowie der natürlichen Killer-Zellen (Hilf, Singh-Jasuja et al. 2002, Czapiga, Kirk et al. 2004, Danese, de la Motte et al. 2004, Elzey, Grant et al. 2005, Li 2008, Iannacone 2016). In diesem Kontext sind Zellkontakt-abhängige Mechanismen über membranständige Moleküle und Rezeptoren der Thrombozyten von Bedeutung. So interagieren Thrombozyten und Lymphozyten über direkten Zell-Zellkontakt in Thrombozyten-Lymphozytenaggregaten über PSGL-1-P-Selektin-Interaktion (Li 2008). Mittels des membranständigen CD40L-CD40-Systems beeinflussen Thrombozyten den B-Zell-Isotyp-Switch und die Keimzentrumsbildung in B-Zellen (Elzey, Ratliff et al. 2011, Herter, Rossaint et al. 2014) und üben einen bahnbrechenden Effekt auf die B- und T-Zell-vermittelten adaptiven Abwehrfunktionen über eine Reifung der antigenpräsentierenden dendritischen Zellen in einer CD40-CD40L-Interaktion aus (Elzey, Tian et al. 2003, Iannacone 2016).

5.2.2.3 Die posttraumatische Rolle der Thrombozyten

Im Rahmen traumatischer Verletzungen spielen Thrombozyten mit ihren hämostaseologischen und immunologischen Kapazitäten eine zentrale Rolle in der Reaktion des Organismus auf die Verletzung.

5.2.2.3.1 Die traumainduzierte Koagulopathie

Ein Viertel aller Traumapatienten entwickeln posttraumatisch eine traumainduzierte Koagulopathie (engl. *trauma induced coagulopathy*, TIC), welche mit schlechtem Outcome und erhöhter Mortalität einhergeht (Brohi, Singh et al. 2003, Niles, McLaughlin et al. 2008). Eine TIC ist definiert durch ein Versagen der Blutgerinnung auf kapillärer Ebene, das in Blutungen unverletzter Körperregionen und Organe resultiert (Chang, Cardenas et al. 2016). Die TIC ist eine komplexe Störung interdependenter koagulatorischer Prozesse; so sind bei der TIC die primäre und sekundäre Hämostase sowie die Fibrinolyse gestört. Beispielsweise trägt eine erhöhte Aktivität des aktivierten Protein C (APC) - getriggert durch Hypoperfusion - über seine antikoagulatorische

Wirkung zu Gerinnungsstörungen bei (Cohen, Kutcher et al. 2013). Konzepte der TIC gehen von einer bidirektionale Dysregulation des Endothels bei Blutverlust aus - sowohl prokoagulatorischer Natur, um Blutverluste zu begrenzen, als auch antikoagulatorischer Natur, um trotz Blutverlust die Endorganperfusion durch Verhinderung mikrovaskulärer Thrombosen zu sichern (Johansson and Ostrowski 2010). Zudem zeigte einer Studie von Burggraf et al. bei polytraumatisierten Patienten, dass nach Trauma sowohl die mediane Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII als auch die Serumlevel von Fibrinogen und Calcium signifikant erniedrigt sind, was sich laborchemisch in einer Verlängerung der INR niederschlägt (Burggraf, Payas et al. 2015). Eine Studie von Cotton et al. zeigte eine Assoziation zwischen einer überschießenden plasminabhängige Degradierung des Fibrinnetzwerkes und tödlicher Blutung nach Trauma (Cotton, Harvin et al. 2012). Die Thrombozyten spielen als zellulärer Teil der Gerinnung sowohl qualitativ als auch quantitativ eine zentrale Rolle in der Genese der TIC. So ist eine Thrombozytopenie mit Blutungen und Mortalität nach Trauma assoziiert (Schnuriger, Inaba et al. 2010, Brown, Call et al. 2011), aber auch bei einer Thrombozytenzahl im Referenzbereich kann es zu einer Funktionsstörung der Thrombozyten kommen (Kutcher, Redick et al. 2012). So zeigte eine Studie von Kutcher und Koautoren, dass 90% der Traumapatienten im Laufe der intensivstationären Behandlung eine Thrombozytenhypofunktion nach Stimulation aufweisen, welche - bei Aufnahme des Patienten bestehend - zu einer 10fach erhöhten Mortalität führt (Kutcher, Redick et al. 2012). Im Kontext der thrombozytären Hypofunktion wurde das Konzept der „thrombozytären Erschöpfung“ im traumatischen Kontext diskutiert (Jacoby, Owings et al. 2001), das mit einer geminderten thrombozytären Funktion bis zu 24h nach dem Trauma einhergeht (Pareti, Capitanio et al. 1980). Aufgrund dieser Studienergebnisse hypothesieren Chang und Koautoren, dass Thrombozyten-Dysfunktion eine der frühesten und sensitivsten Indikatoren einer TIC ist (Chang, Cardenas et al. 2016). In einer Studie von Kornblith et al. zeigte sich, dass die thrombozytäre Funktion im Vergleich zur Rolle des Fibrins in der Bildung eines Blutgerinnsels im viskoelastischen Messverfahren der Thromboelastografie (TEG) nach Trauma deutlich abnimmt (Kornblith, Kutcher et al. 2014).

5.2.2.3.2 Die posttraumatische immunologische Funktion der Thrombozyten

Die speziell immunologische Funktion der Thrombozyten nach Trauma ist im Gegensatz zur hämostatischen Funktion vergleichsweise spärlich untersucht. Durchflusszytometrische Studien bei Polytraumapatienten, u.a. von Jacoby und Koautoren, zeigten eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin, welches einen Marker für die thrombozytäre Degranulation immunologisch wirksamer

Inhaltsstoffe ist (Jacoby, Owings et al. 2001, Garraud, Hamzeh-Cognasse et al. 2013). Des Weiteren konnte bei systemischer inflammatorischer Reaktion nach Trauma in der Durchflusszytometrie eine erhöhte Produktion von thrombozytären Mikropartikeln (engl. *platelet microparticles*, PMP) gemessen werden, welche über eine Beeinflussung der Endothelzellen und Leukozyten immunologisch agieren können (Jacoby, Owings et al. 2001, Ogura, Kawasaki et al. 2001). Eine murine Studie von Fujimi und Koautoren konnte zeigen, dass eine Thrombozytendepletion mit einer deutlich erhöhten Mortalität nach Verbrennungstrauma einhergeht. Diese Mortalität ist - wie autoptisch untersucht - nicht durch die hämostatischen Kapazitäten der Thrombozyten bedingt, sondern es wurde eine Änderung im immunologischen Zytokinprofil bzgl. TNF- α , IL-6, MCP-1 und TGF- β gemessen (Fujimi, MacConmara et al. 2006). Diese Studie lieferte erstmals deutliche Hinweise, dass Thrombozyten über ihr immunologisches Potenzial nach Trauma auch immunologisch protektiv wirken.

Da eine traumatische Verletzung mit einer systemischen inflammatorischen Reaktion einhergeht (Lenz, Franklin et al. 2007), können theoretische Rückschlüsse über die thrombozytäre Funktion unter inflammatorischen Bedingungen auch aus septischen Krankheitsbildern gezogen werden, bei denen die thrombozytäre Funktion deutlich besser untersucht ist. Thrombozyten agieren in diesem Setting über multiple Mechanismen immunologisch; Greco und Koautoren haben die Literatur hierzu zusammengefasst (Greco, Lupia et al. 2017). Nach der Analyse der Autoren ist eine niedrige Anzahl an Thrombozyten-Leukozytenkomplexen sowie eine Thrombozytopenie als Zeichen eines erhöhten Verbrauchs mit einem Organversagen und einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet (Greco, Lupia et al. 2017).

Die kausalen pathophysiologischen Zusammenhänge, die zu der posttraumatisch verschlechterten Gerinnungsfunktion sowie potenziellen immunologischen Konsequenzen führen, sind noch nicht genau verstanden. Das verbesserte Verständnis der zellulären wie humoralen Interaktionen der Thrombozyten nach Trauma bietet gerade vor dem Hintergrund von Transfusionen und thrombozytenhemmenden Medikamenten im klinischen Alltag Potenzial für die verbesserte Versorgung polytraumatisierter Patienten.

5.2.3 Die Interaktion von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten nach Trauma

Vor dem Hintergrund der Erforschung protektiver posttraumatischer Immunreaktionen ist besonders die Interaktion der Thrombozyten mit der erworbenen Immunabwehr in Form von CD4⁺ T-Zellen von Interesse (Zhu, Huang et al. 2014). Diese Zellinteraktion

wurde schon für verschiedene inflammatorische Krankheitsbilder wie der rheumatoiden Arthritis (Zamora, Canto et al. 2013) Leber-Ischämie-Reperfusion (Khandoga, Hanschen et al. 2006) und Atherosklerose (Li 2013) untersucht. Des Weiteren ist auch eine Interaktion von Thrombozyten und dem in 5.2.1 detailliert vorgestellten posttraumatisch bedeutsamen $CD4^+$ Treg Subtyp bekannt (Sadallah, Amicarella et al. 2014). Dieser Mechanismus ist sowohl in entzündlichen (Ponomarev 2018) als auch neoplastischen (Nasti, Bullard et al. 2015) Krankheitsbildern als Zell-Interaktions-Mechanismus untersucht. Physiologisch ist die Interaktion dieser Zelltypen interessant, weil Thrombozyten und $CD4^+$ Tregs ähnliche Funktionsqualitäten aufweisen. Hier zählen unter anderem eine erhöhte Sensitivität beider Zelltypen auf das extrazelluläre Mikroumfeld, die Fähigkeit zur schnellen Antwort auf immunologische Stimuli die Fähigkeit zur Erkennung von DAMPs (Stoecklein, Osuka et al. 2012, Lukasik, Makowski et al. 2018). Auch die Fähigkeit zur Kommunikation mit anderen Zelltypen - sowohl parakrin über immunologisch aktive Mediatoren, als auch über direkten Zell-Zellkontakt - und das damit verbundene immunmodulatorische Potenzial zeichnet beide Zelltypen aus. Auffallend ist zudem die Ansprache derselben Interaktionspartner (u.a. $CD4^+$ non-Tregs und dendritischen Zellen) (Elzey, Sprague et al. 2005, Matarese, De Rosa et al. 2008). Bergmann et. al haben 2016 erstmals die Hypothese einer posttraumatischen Interaktion zwischen Thrombozyten und $CD4^+$ Tregs nach Trauma untersucht. Es konnte in einem Verbrennungsmodell mit jeweiliger Depletion der relevanten Zelltypen gezeigt werden, dass $CD4^+$ Tregs und Thrombozyten sich früh posttraumatisch reziprok aktivieren. Posttraumatisch werden $CD4^+$ Tregs früh nach der Verletzung Thrombozyten-abhängig aktiviert und beeinflussen reziprok die Hämostase (Bergmann, Hefele et al. 2016).

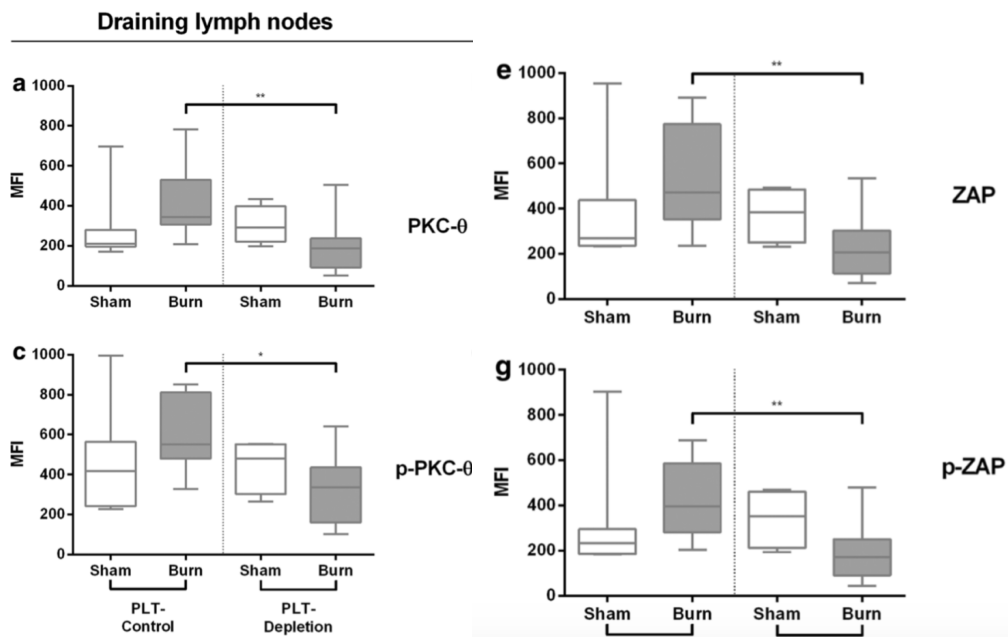


Abbildung 2 Eine Depletion der Thrombozyten ist mit einer Störung der posttraumatischen Aktivierung verbunden.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von ZAP-70, pZAP-70, PKC-θ und pPKC-θ von CD4⁺ Tregs, isoliert aus den Lymphknoten von scheinbehandelten und verbrennungstraumatisierten Wildtyp-Tieren mit und ohne Thrombozytendepletion. Hierdurch wurde die aktivierende posttraumatische Wechselwirkung zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten erstmals demonstriert. Reprinted by permission from Springer Nature: Springer Nature, Immunol Res., Bergmann, C.B., et al., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4⁺ T regulatory cells in a mouse model. 64(2): p. 508-17. © 2020 Springer Nature Switzerland AG, 2016, license number 4933571193537.

5.2.4 Die Forschung zu posttraumatischen immunologischen Prozessen

Insgesamt wurden in den letzten Jahren große Fortschritte in der Erforschung von CD4⁺ Treg-Biologie, Thrombozyten-Biologie und Einflüssen auf die komplexe immunologische Balance des Organismus erzielt. In der Traumaforschung besteht jedoch weiterhin Potenzial, durch das Verständnis klinisch relevanter physiologischer Regulationsketten das Management traumatisierter Patienten zu verbessern. Die Entdeckung der posttraumatischen Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten, die den überwiegend proinflammatorisch wirkenden Thrombozyten über die Beeinflussung der CD4⁺ Tregs eine Rolle in immunsuppressiven Prozessen einräumt, lieferte einen neuen Aspekt in der Erforschung protektiver Immunprozesse nach Trauma. Die Mechanismen dieser Interaktion sind aktuell noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der hohen klinischen Relevanz der posttraumatischen Immundysbalance im Kontext der Versorgung polytraumatisierter Patienten besteht die Notwendigkeiten der mechanistischen Erforschung dieser für den Organismus potenziell protektiven Interaktion. Eine genaue Kenntnis der Mechanismen bietet in klinischer Translation perspektivisch die Möglichkeit, Immunfunktionen anhand aussagekräftiger Marker zu

überwachen und optimale Zeitpunkte für Intervention zu definieren sowie die Option, protektiv immunpharmakologisch zu intervenieren.

5.3 Die posttraumatische Interaktion von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten

5.3.1 Der aktuelle Stand der Forschung zu Mechanismen der Interaktion

Zum aktuellen Zeitpunkt wird der Schlüsselmechanismus der posttraumatischen Interaktion der CD4⁺ Tregs und der Thrombozyten in Studien zwar untersucht, ist aber bis dato nicht abschließend geklärt (Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018). Der vielseitigen biophysiologicalen Konfiguration der CD4⁺ Tregs und der Thrombozyten geschuldet, werden aktuell mehrere Mechanismen untersucht.

Bock et al. haben 2018 die Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten und über parakrine Interaktionen analysiert und dabei herausgefunden, dass eine Interaktion über Signalkaskaden via TNF- α , TNF-Rezeptor-2 (TNFR2) und TLR-4 stattfindet, jedoch nicht über IL-10. Des Weiteren werden Einflüsse über die Thrombozytenaggregation via dem GPIIb/IIIa-Rezeptor und die thrombinabhängige Thrombozytenaktivierung via dem Protease-aktivierenden-Rezeptor-4 (PAR-4) untersucht, welche in dieser Dissertation jedoch nicht behandelt werden. Aufgrund des potenten immunologischen Rezeptorpotentials von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten (Herter, Rossaint et al. 2014, Hall 2015) und der beobachteten Bildungen von Thrombozyten-Lymphozyten-Aggregaten (Li 2008, Herter, Rossaint et al. 2014, Lukasik, Makowski et al. 2018) wurde in dieser Arbeit die mögliche Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über direkten Zell-Zellkontakt untersucht.

5.3.2 Potenzielle Signalwege für eine Interaktion im direkten Zell-Zellkontakt

In-vitro Experimente von Danese und Koautoren zeigten, dass CD40L-positive Thrombozyten durch CD40-exprimierende T-Zellen zellkontaktabhängig aktiviert werden. Über die Sezernation des in den Thrombozytengranula gespeicherten Chemokins RANTES (engl. *regulated and normal T-cell expressed and secreted*, dt. reguliert und normal T-Zell-exprimiert und sezerniert) kommt es konsekutiv zu einer aktivierenden Rückkopplung, innerhalb der CD4⁺T-Zellen reziprok aktiviert werden (Danese, de la Motte et al. 2004). Weiterführende in-vivo Studien im hepatischen Ischämie-Reperfusion-Modell ergaben Hinweise, dass eine kostimulatorische Interaktion zwischen CD40 der T-Zellen und CD40L der Thrombozyten stattfindet (Khandoga,

Hanschen et al. 2006). Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage zu Untersuchung der Hypothese, dass eine posttraumatische Interaktion im direkten Zellkontakt zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten CD40-CD40L-vermittelt stattfindet.

Eine weitere Analyse der Literatur zeigte, dass die Bildung von Thrombozyten-Lymphozyten-Aggregaten zellkontaktvermittelt in Abhängigkeit des Adhäsionsmoleküls mediiert wird. So wird die Aggregation der beiden Zelltypen entscheidend durch eine Interaktion des P-Selektin auf Thrombozyten und P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) der CD4⁺T-Zellen vermittelt - sowohl in vitro (Li, Ji et al. 2006) als auch in vivo (Khandoga, Hanschen et al. 2006). Diese Studienlage bildete die Grundlage zur Untersuchung der Fragestellung, ob im posttraumatischen Kontext eine aktivierende Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über P-Selektin-abhängigen Zell-Zellkontakt stattfindet.

5.3.3 Die Rolle von CD40-Ligand in Immunologie und Hämostase

CD40-Ligand (CD40L, CD154) und CD40 sind ein kostimulatorisches Ligand-Rezeptor-Paar der TNF(-Rezeptor)-Familie. CD40L wird auf vorwiegend auf aktivierten T- und B-Zellen und auch Thrombozyten unter entzündlichen Bedingungen exprimiert; nach inflammatorischen Stimuli auch auf Monozyten, natürlichen Killerzellen, Mastzellen und Basophilen (Kumanogoh, Wang et al. 2001, Martin, O'Sullivan et al. 2003, Guiducci, Valzasina et al. 2005, Spence and Green 2008, Elgueta, Benson et al. 2009, Martin, Agarwal et al. 2010, Li, Carlson et al. 2011). CD40 wird auf Thrombozyten, B-Zellen, T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert (Henn, Steinbach et al. 2001, Schonbeck and Libby 2001, Inwald, McDowall et al. 2003, Danese, de la Motte et al. 2004).

In seiner kostimulatorischen Funktion wird die CD40L-CD40 Interaktion zur Initiation einer Immunantwort der CD4⁺T-Zellen benötigt. Im Prozess der T-Zell-Aktivierung erfolgt das erste Aktivierungssignal antigenspezifisch über den CD4⁺T-Zell-Rezeptor in einer Interaktion mit den MHC-Molekülen auf dem APZ. Dieses erste Signal muss durch einen zweiten, nicht-antigen-spezifisches Signal eines kostimulatorischen Rezeptor-Liganden-Paars verstärkt werden, um eine vollwertige Immunantwort zu generieren. Die CD40-CD40L Interaktion führt zu einer Aktivierung der APZ, welche wiederum weitere T-Zellen aktiviert (Hall 2015).

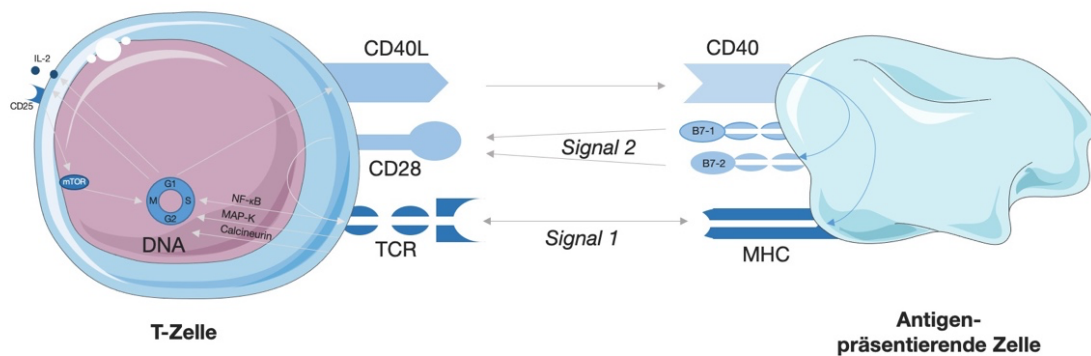


Abbildung 3 CD40L-abhängige T-Zell-Aktivierung

Das erste Signal erfolgt durch Aktivierung des TZR durch Antigen präsentiert auf durch die APZ. Das zweite Signal erfolgt durch Kostimulation durch B7-1 und B7-2 der APZ, welche CD28 auf der T-Zelle stimuliert. Nachgeschaltet werden drei Transduktionsketten aktiviert (NF-κB sowie MAP-Kinase und Calcineurin-abhängige Signalwege), welche zu einer Produktion verschiedener Faktoren führen, u.a. IL-2, der α-Kette von CD25 und CD40 Ligand.

Darstellung angelehnt an: Snanoudj, R., et al., *The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept. Biologics, 2007. 1(3): p. 203-13.* (Snanoudj, Frangie et al. 2007)

Im inflammatorischen Kontext führt eine CD40L-CD40-Ligation zur Expression verschiedener proinflammatorischer und prothrombotischer Gene wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ, TNF-α oder MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein*, dt. Monozytenattraktionsprotein 1) (Chatzigeorgiou, Lyberi et al. 2009). Die immunologische Rolle des CD40L-CD40 Rezeptor-Liganden-Paars ist bereits untersucht in verschiedenen inflammatorischen Pathologien (Chatzigeorgiou, Lyberi et al. 2009) wie Atherosklerose (Lievens, Zerneck et al. 2010, Winkels, Weber et al. 2014) oder Autoimmunerkrankungen (Datta and Kalled 1997). Speziell im regulatorischen CD4⁺T-Helfer-Zelltyp, den CD4⁺ Tregs, wurde beobachtet, dass CD40L-CD40 eine wichtige Rolle für die Entwicklung (Spence and Green 2008) und Homöostase (Guiducci, Valzasina et al. 2005) spielt. Verschiedene Studien wiesen zudem eine Expression von CD40L auf CD4⁺ Tregs nach (Kumanogoh, Wang et al. 2001, Martin, O'Sullivan et al. 2003, Guiducci, Valzasina et al. 2005, Spence and Green 2008, Martin, Agarwal et al. 2010, Li, Carlson et al. 2011). Zudem ist bekannt, dass CD40L neben den immunologischen Kapazitäten auch aktivierend auf die hämostatische Funktion der Thrombozyten wirkt. CD40L kann Thrombozyten sowohl direkt über die Bindung von CD40 und GPIIb/IIIa aktivieren, als auch indirekt über die Induktion von Gewebefaktor auf Monozyten (Aloui, Prigent et al. 2014). Über die Bindung von GPIIb/IIIa mediiert CD40L Thrombozytenaggregation und modifiziert die Stabilität der arteriellen Thrombi, die Bindung von Fibrinogen, die thrombinvermittelte Aktivierung von Thrombozyten

und die Induktion einer selbstverstärkenden Feedbackschleife über die Induktion einer CD40L-Expression auf Thrombozyten (Aloui, Prigent et al. 2014, Horrillo, Fontela et al. 2014). Eine verstärkte Expression von Gewebefaktor induziert zusätzlich die Initiation des extrinsischen Wegs der Gerinnung (Thomas and Storey 2015). Über diese Mechanismen kann CD40L Thrombozyten sowohl direkt über die Bindung von CD40 und GPIIb/IIIa stimulieren als auch indirekt über die Induktion von Gewebefaktor auf Monozyten (Lindmark, Tenno et al. 2000, Andre, Prasad et al. 2002, Aloui, Prigent et al. 2014).

5.3.4 Die Rolle von P-Selektin in Immunologie und Hämostase

Das Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P) ist Teil der Ca²⁺-abhängigen Lektine und bindet ausschließlich an den Rezeptor P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (Furie, Furie et al. 2001). P-Selektin ist u.a. in α -Granula der Thrombozyten und den Weibel-Pallade-Körpern der Endothelzellen gespeichert. Bei Aktivierung der Thrombozyten z.B. durch Thrombin wird P-Selektin an die Zelloberfläche transportiert, wo es seine biologische Wirkung entfaltet (Kutlar and Embury 2014) - es wird deswegen auch als phänotypischer und funktioneller Aktivierungsmarker der Thrombozyten angesehen (Klinger 1997). Zudem existiert eine lösliche Form des Moleküls im Blutplasma (Dunlop, Skinner et al. 1992). Die Hauptfunktion des Moleküls besteht in der Vermittlung einer Zelladhäsion der Thrombozyten an andere Zelltypen wie z.B. Leukozyten und Endothelzellen (Palabrica, Lobb et al. 1992, Li 2008, Herter, Rossaint et al. 2014). P-Selektin ist bei inflammatorischen Pathologien wie Autoimmunerkrankungen (Suzuki, Sugimura et al. 2001), Hypercholesterinämie und kardiovaskulären Erkrankungen (Stokes, Calahan et al. 2006, Stokes and Granger 2012) klinisch relevant. Der Ligand für P-Selektin, der P-Selektin-Rezeptor PSGL-1, wird von quasi allen Leukozyten, u.a. auf T-Zellen exprimiert (Andre 2004, Abadier and Ley 2017). Die adhäsive P-Selektin – PSGL-1 Interaktion ist für die T-Zell-Migration in Homöostase als auch nach einem entzündlichen Stimulus für die T-Zell-Rekrutierung in das entzündete Gewebe wichtig (Abadier and Ley 2017, Tinoco, Otero et al. 2017). Im Tiermodell wurde zudem gezeigt, dass P-Selektin-Rezeptor PSGL-1 immunregulierende Funktionen auf T-Zell-Rezeptor-Signalwege, IL2-Ausschüttung und PD-1-Regulation ausübt (Tinoco, Carrette et al. 2016). Tinoco und Koautoren postulierten demnach eine Rolle als Immun-Checkpoint-Regulator für das Molekül (Tinoco, Carrette et al. 2016). Kohm et al. konnten in einer murinen Studie zeigen, dass die P-Selektin-Expression auf

den CD4⁺ Tregs, signifikant höher als auf CD4⁺T-Effektorzellen ist (Kohm, Carpentier et al. 2002). Des Weiteren konnten die Autoren in einem weiteren Experiment zeigen, dass P-Selektin ein essentielles Molekül in der CD4⁺ Treg-Differenzierung und Funktion ist (Kohm and Miller 2003).

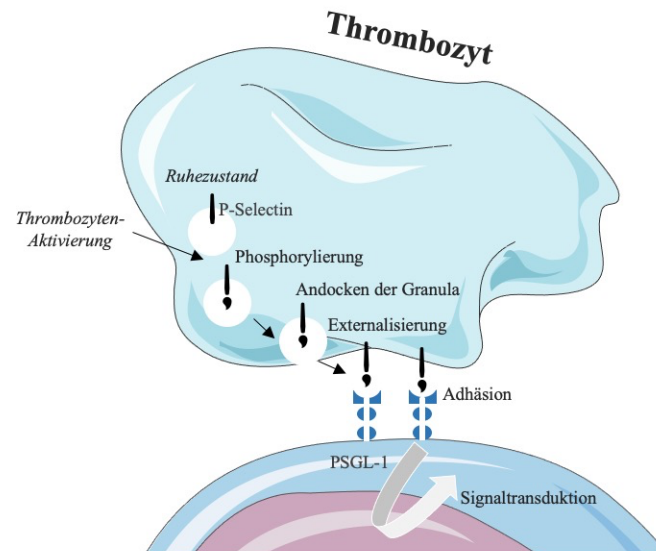


Abbildung 4 Aktivierungsprozess des thrombozyten-basierten P-Selektins

Im thrombozytären Ruhezustand ist P-Selektin in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert. Thrombozytenaktivierung bewirkt eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von P-Selektin. Nachgeschaltet kommt es zu einer Fusion der α -Granula mit der Thrombozyten-Zellmembran. Dies resultiert in einer Translokation der extrazellulären Domäne des P-Selektins nach extrazellulär. Über diese Domäne interagiert P-Selektin mit Adhäsionsmolekülen anderer Zellen, beispielsweise PSGL-1.

Darstellung angelehnt an: Furie, B., B.C. Furie, and R. Flaumenhaft, A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, 2001. 86(1): p. 214-21.(Furie, Furie et al. 2001)

6 Fragestellungen und Hypothesen

Die Mechanismen protektiver immunologischer Prozesse nach Trauma sind bis dato nicht abschließend geklärt; verschiedene Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass CD4⁺ Tregs und Thrombozyten von essentieller Bedeutung in der konzertierten posttraumatischen Immunantwort sind. Basierend auf der Beobachtung einer reziproken Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten nach Trauma, sowie den Arbeiten, die eine Interaktion von CD4⁺T-Zellen und Thrombozyten über direkten Zellkontakt via CD40L/CD40 und P-Selektin/PSGL-1 beobachteten, wurden folgende Fragen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit untersucht:

6.1 Wird die frühe posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt via CD40-Ligand moduliert?

Es wurde die erste Primärhypothese aufgestellt, dass die Aktivierung der CD4⁺ Tregs bei Gen-Defizienz von CD40L im Vergleich zu Wildtyptieren posttraumatisch verändert ist.

6.2 Wird die thrombozytäre Funktion nach Trauma CD40L-abhängig moduliert?

Es wurde die erste Sekundärhypothese aufgestellt, dass die Thrombozytenfunktion bei Gen-Defizienz von CD40L im Vergleich zu Wildtyptieren posttraumatisch verändert ist.

6.3 Wird die frühe posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt via P-Selektin moduliert?

Es wurde die zweite Primärhypothese aufgestellt, dass die Aktivierung der CD4⁺ Tregs bei Gen-Defizienz von P-Selektin im Vergleich zu Wildtyptieren posttraumatisch verändert ist.

6.4 Wird die thrombozytäre Funktion nach Trauma P-Selektin-abhängig moduliert?

Es wurde die zweite Sekundärhypothese aufgestellt, dass die Thrombozytenfunktion bei Gen-Defizienz von P-Selektin im Vergleich zu Wildtyptieren posttraumatisch verändert ist.

Diese Forschungsfragen sollten in einem repräsentativen, validierten experimentellen in-vivo Modell untersucht werden. Über die Beantwortung dieser Forschungsfragen und das Bestätigen oder Verwerfen der jeweiligen Hypothesen sollte geklärt werden, ob CD4⁺ Tregs und Thrombozyten posttraumatisch über direkten Zell-Zellkontakt über CD40L oder P-Selektin interagieren. Die Ergebnisse fließen in eine komprehensive Analyse der Mechanismen der potenziell protektiven Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten nach Trauma ein. Ein besseres mechanistisches Verständnis der Immunantwort auf Trauma bietet perspektivisch die Grundlage für die Entwicklung verbesserter Überwachungs- und Versorgungskonzepte polytraumatisierter Patienten.

7 Material und Methoden

7.1 Vorbemerkungen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden in der Abteilung für experimentelle Unfallchirurgie des Klinikum Rechts-der-Isar der Technischen Universität München zwischen März 2016 und Januar 2017 mit der Genehmigung der zuständigen Abteilung der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-164-12) durchgeführt. Während insbesondere in der Analytik der generierten Daten eine originäre Methodik etabliert wurde, orientierten sich Grundzüge der eingesetzten Methoden an dem in einer Grundsatzbeweis-Studie verwendeten Modell, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten und potentiell kausale Rückschlüsse zuzulassen (Bergmann, Hefele et al. 2016).

7.2 Versuchstiere

Im Kontroll-Studienarm wurden männliche C57BL/6N Wild-Typ-Mäuse (8-10 Wochen alt) mit einem Körpergewicht von 22-26g untersucht. Zur Testung der Hypothesen wurden männliche CD40L-defiziente Tiere von Typ B6.12952-Cd40lg^{tm1lmx/g} und P-Selektin-defiziente Tiere vom Typ B6.12957-Selp^{tmBay/J} (8-10 Wochen alt) verwendet. Alle Tiere wurde von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Die Tiere wurden sieben Tage im Zentrum für präklinische Studien des Klinikum Rechts-der-Isar gehalten und akklimatisiert. Ein 12-Stunden Licht/Dunkelheit-Regime und vollstandardisierte Versorgung in Form von Wasser und Futter *ad libitum* sowie kontrollierte Temperatur und Feuchtigkeit in einer virusfreien Umgebung wurde gewährleistet. Konsekutiv wurde eine Randomisierung der Tiere Scheininterventionsgruppe und Verbrennungsinterventionsgruppe unter Berücksichtigung der ARRIVE-Richtlinien implementiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 In den verschiedenen Studienarmen eingesetzte Mausstämme

Versuchstier-Typ	Mausstamm	Intervention
Wildtyp	C57BL/6N	Scheinintervention
Wildtyp	C57BL/6N	Verbrennungsintervention
CD40L ^{KO}	B6.12952 Cd40lg ^{tm1lmx/g}	Scheinintervention
CD40L ^{KO}	B6.12952-Cd40lg ^{tm1lmx/g}	Verbrennungsintervention
P-Sel ^{KO}	B6.12957-Selp ^{tmBay/J}	Scheinintervention
P-Sel ^{KO}	B6.12957-Selp ^{tmBay/J}	Verbrennungsintervention

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention in der jeweiligen Studiengruppe.

7.3 Reagenzien

7.3.1 Chemikalien und Puffer

In Rahmen der Experimente wurden die in Tabelle 3 detailliert aufgeführten Chemikalien und Puffer eingesetzt. Im Rahmen der Aktivitätsmessung der CD4⁺ Tregs wurden die Zellen der drainierenden Lymphknoten und Milz in einem C5 Kulturmedium suspendiert. Mit dem Lyse-Puffer wurden die Zellen aus dem Milzgewebe vor der Färbung behandelt. Paraformaldehyd unterschiedlicher Konzentration wurde im Rahmen des Färbungsprozess für die Zellfixierung und ein PBA-Puffer für die Waschvorgänge verwendet. Methanol wurde für die Zellpermeabilisierung für die intrazelluläre Färbung eingesetzt. Die Citratlösung wurde dem entnommenen murinen Blut vorbereitend für die Rotationsthromboelastometrie zur Untersuchung der Gerinnungsparameter zugegeben.

Tabelle 3 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Chemikalien und Puffer

Chemikalien/ Puffer	Enthaltene Reagenzien, Hersteller
C5 Kulturmedium	2-Mercaptoethanol, Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA) 5% FBS, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) HEPES Pufferlösung 1 M, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) L-Glutamine 200 mm, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Penicillin/Streptomycin, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) RPMI 1640 in Versatz mit MEM, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Citratlösung	3,1%iges Trisodium-Citrat, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) ddH ₂ O, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
ddH ₂ O	ddH ₂ O, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Lysepuffer	Ammonium Chlorid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) ddH ₂ O, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) Dextrose HEPES Pufferlösung, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
PBA Puffer	Albumin (Rinderserum) PBS Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Sodium Azid, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS	PBS, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PFA (0,15% & 0,3%)	Paraformaldehyd-Lösung, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) PBS, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Dargestellt sind die Puffer und Chemikalien, die in den Versuchen verwendet wurden, sowie deren Zusammensetzung und Hersteller

7.3.2 Antikörper

Im Rahmen der Phospho-Durchflusszytometrie wurden für die Validierung des Versuchsmodells sowie die Aktivitätsmessung der CD4⁺ Tregs die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper verwendet. Durch Verwendung eines Fc-Blocks wurde eine unspezifische und damit falsch-positive Bindung der Antikörper an den Fc-Rezeptoren an Stelle der antikörper-spezifischen Fab-Domäne der Immunzellen verhindert. Mittels Oberflächenfärbung der Zellen mit anti-CD4-Antikörpern wurde die Identifikation der T-Helferzellen ermöglicht. Über eine intrazelluläre Färbung mit anti-FoxP3 Antikörper wurde der regulatorische CD4⁺T-Zell-Subtyp identifiziert. Anti-PKC θ , anti-p-PKC θ , anti-ZAP-70 und anti-p-ZAP-70 wurden zur Färbung der intrazellulären Signalmoleküle Proteinkinase C θ (PKC) und ζ -assoziiertes Protein von 70 kDa (ZAP) sowie deren phosphorylierten Formen verwendet. Das konjugierte F(ab)'₂ Fragment Alexa Fluor_555 wurde zur sekundären Detektion des Aktivitätssignals eingesetzt.

Tabelle 4 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Antikörper

Antikörper (Antikörpertyp)	Fluoro- chrom	Reaktivität	Hersteller
Alexa Fluor_555 [konjugiertes F(ab)' ₂ Fragment] (intrazellulär, sekundärer AK)	Alexa Fluor 555	Ziege anti-Kaninchen	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
anti-CD16/32 (Fc-Block)	-	anti-Maus	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD4 (extrazellulär)	APC	anti-Maus	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-FoxP3 (intrazellulär)	FITC	anti-Maus	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-p-PKC θ (Thr 538) (intrazellulär, primärer AK)	-	Kaninchen anti-Maus	CellSignaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-p-ZAP-70 (Tyr 493) (intrazellulär, primärer AK)	-	Kaninchen anti-Maus	CellSignaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-PKC θ (P632) (intrazellulär, primärer AK)	-	Kaninchen anti-Maus	CellSignaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-ZAP-70 (99F2) (intrazellulär, primärer AK)	-	Kaninchen anti-Maus	CellSignaling Technology (Danvers, MA, USA)

Dargestellt sind die in der durchflusszytometrischen Färbung eingesetzten Antikörper sowie Informationen zu deren Reaktivität und Fluorochrom und dem Hersteller

7.4 Medikamente

Im Rahmen des Verbrennungsmodells wurden die Tiere gewichtsadaptiert mit Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) und Xylazin (Xylavet®, CP-Pharma Handelsges.mbH, Burgdorf) verdünnt mit 0,9% NaCl (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) analgesiert. Die eingesetzten Medikamente sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 Gemäß Versuchsprotokoll eingesetzte Medikamente

Medikamente	Handelsname	Hersteller
Kochsalzlösung	0,9%NaCl	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin	Ursotamin®	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Xylazin	Xylavet®	CP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf, Deutschland

Dargestellt sind die in der Narkose eingesetzten Narkotika sowie deren Handelsname und Hersteller

7.5 Geräte

Ein Rasierapparat (Modell HC-5600, Remington, Middleton, Wisconsin, USA) wurde für die Rasur des Rückenfalls der Versuchstiere verwendet. In einem Wasserbad (JBN5, Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK) wurde das Verbrühungstrauma induziert. Mit dem MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden die phospho-durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt. Die Funktion und Instandhaltung des Geräts wurde mit den Agenzien MACSQuant® Running Buffer, MACSQuant® Storage Solution, MACSQuant® Washing Solution und MACSQuant® Calibration Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gesichert. Mit dem ROTEM®delta (TEM International, München, Deutschland) wurden die rotationsthromboelastometrische Messungen durchgeführt. Bei den Messungen wurden star-tem® und ex-tem® Reagenzien (TEM International, München, Deutschland) eingesetzt.

7.6 Traumamodell

Zur Simulation eines Traumas mit einem adäquaten reproduzierbaren immunologischen Stimulus wurde das in der Literatur gut beschriebene murine Verbrennungsmodell eingesetzt. Der schematische Aufbau des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 5 dargestellt.

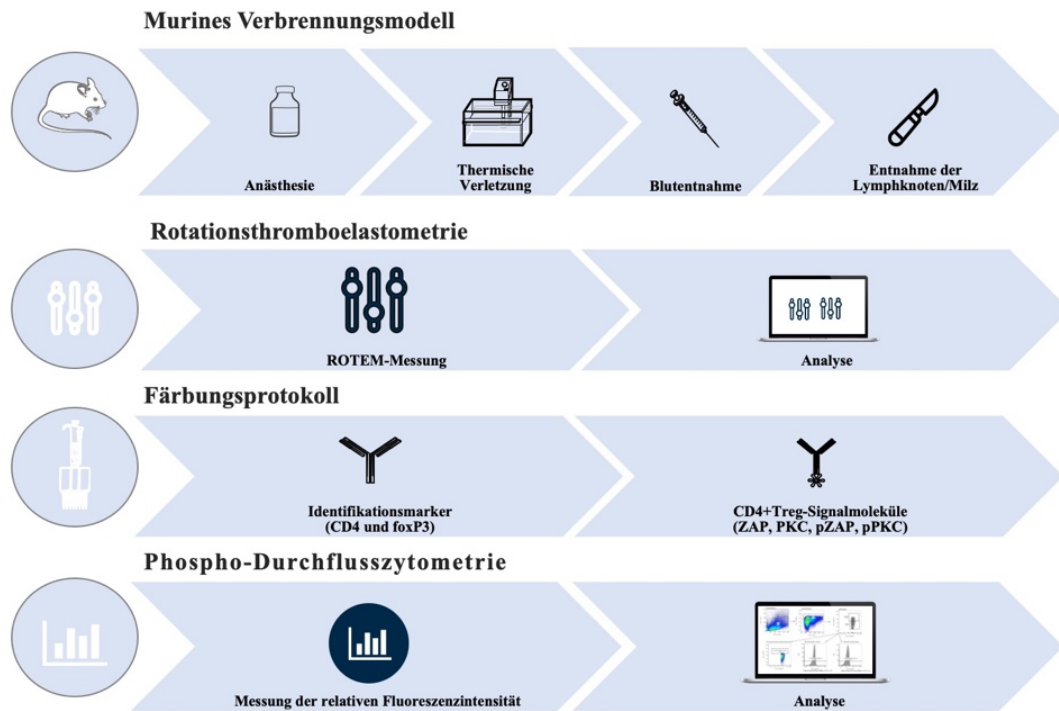


Abbildung 5 *Schematischer Versuchsaufbau*

Dargestellt ist der schematische (vereinfachte) Versuchsaufbau, den jeder Studienarm im Rahmen des Versuchsprotokolls durchlief (exemplarisch dargestellt der Studienarm mit Verbrennungsintervention). In einem ersten Schritt erfolgte die Narkose, Intervention und Gewebeentnahme. In einem zweiten Schritt erfolgte die Messung der rotationsthromboelastometrischen Parameter mittels ROTEM® delta. Subsequent wurde das Färbungsprotokoll durchlaufen und in einem letzten Schritt die Phospho-Durchflusszytometrie durchgeführt.

7.6.1 Analgesie und Narkose

Alle Versuche dieser Arbeit wurden unter Allgemeinanästhesie durchgeführt, in welcher die Tiere bis zur Euthanasie belassen wurde. Eine gewichtsadaptierte Mischung aus Ketamin/Xylazin und 0,9% Kochsalzlösung (Ketamin: 200mg/kgKG; Xylazin: 10mg/kgKG in 200µl) wurde organschonend kontrolliert intraperitoneal verabreicht. Die Narkosetiefe wurde alle 15 min durch Applikation eines adäquaten Schmerzreizes (Zwischenzehenreflex) kontrolliert und bei Bedarf wurde zusätzliches Narkotikum verabreicht.

7.6.2 Traumatische Intervention

Um einen trauma-ähnlichen, hoch-standardisierten und reproduzierbaren immunologischen Stimulus zu generieren, wurde eine Verbrennung III° auf 25% der Körperoberfläche der Versuchstiere durch eine Immersion in ein erhitztes Wasserbad induziert. Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt und wird im Folgenden detailliert erläutert.

Vorbereitend erfolgte unter Narkose eine Rasur des Rückens der Versuchstiere mit dem Rasierer, um ein homogenes Trauma zu gewährleisten. Anschließend wurden die Versuchstiere in die in Abbildung 6 abgebildete Halterung, angefertigt aus einer 50 ml Perfusorspritze, mit dem Rücken in eine vorgefertigte Öffnung gelegt. Diese Öffnung, die 25% der Körperfläche einer 25g schweren Maus entspricht, war auf der Längsseite der Spritze eingebracht worden. Um ein reproduzierbares und verlässliches Trauma zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere von einer bauchseitig eingebrachten kleinen Öffnung mit einem angepassten Schwamm gesichert, der über sanften Druck einen Verschluss der rückenseitigen Öffnung mit dem Rücken der Maus gewährleistet, ohne gleichzeitig die atemmechanischen oder hämodynamischen Bedingungen des Versuchstiere durch eine Änderung der Druckverhältnisse zu kompromittieren.

Die präparierte Spritze wurde griffplattenseitig mit dem gummierten Stempel abgedichtet. Die Spritzendüse wurde offengelassen und bei der Immersion stets über Wasser gehalten wurde, um ein suffizientes Sauerstoffangebot zu gewährleisten.

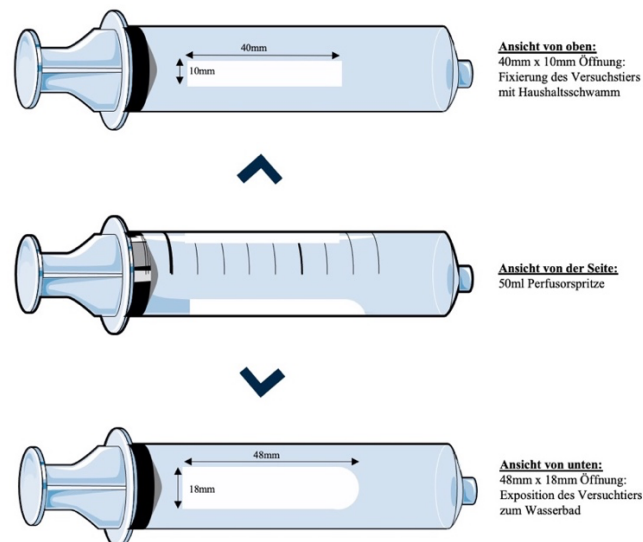


Abbildung 6 Aufbau der Halterung für die Intervention

Dargestellt ist der Aufbau der Halterung, in der die Intervention (Verbrennungstrauma / Scheintrauma) durchgeführt wurde. In der oberen Öffnung wurde ein Schwamm platziert, der das Versuchstier fixierte und durch leichten Druck gegen Bauch der Versuchstiere die untere Öffnung mit dem Rücken wasserdicht abschloss. Mithilfe der unteren Öffnung wurden 25% der Körperoberfläche der Versuchstiere einem 90°C (Verbrennungstrauma) oder 21°C temperierten Wasser (Scheintrauma) exponiert; Zeichnung nicht maßstabsgetreu.

Der Rücken der in die die Halterung eingebrachten Versuchstiere wurde im Rahmen eines Verbrennungstraumas 9 Sekunden vollständig in ein, auf 90° Celsius erhitztes Wasserbad (JBN5, Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK) eingebracht und somit eine Verbrennung III° auf 25% der Körperoberfläche induziert. Hierbei wurde streng darauf geachtet, dass kein Wasser durch die Spritzendüse Zugang zum Versuchstier erhielt, sondern lediglich durch die vorgesehene rückenseitige Öffnung. Anschließend wurden die Versuchstiere zügig aus der Halterung befreit und mit 1 ml einer 0,9% Kochsalzlösung i.p. versorgt, um der frühen Mortalität nach Verbrennung vorzubeugen, die durch den mit einer großflächigen Verbrennung verursachten Flüssigkeitsverlust bedingt ist. Der Ablauf ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

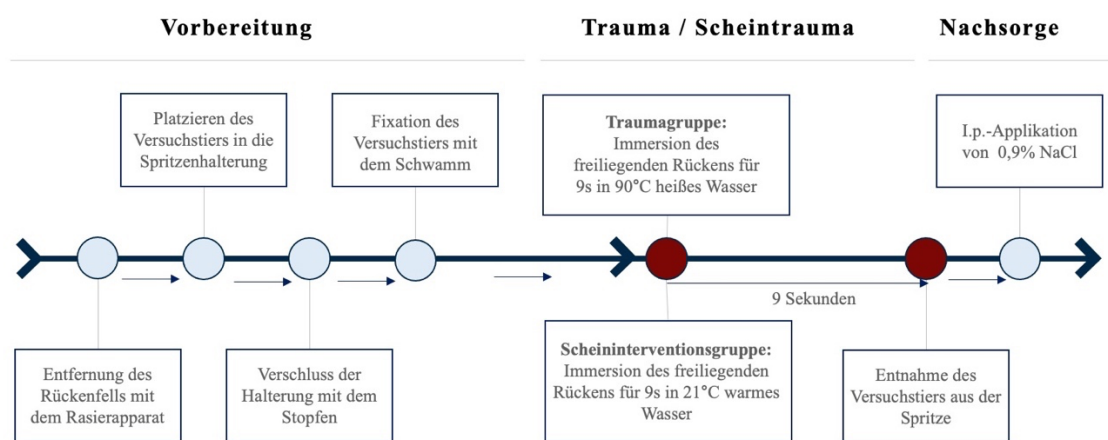


Abbildung 7 **Zeitlicher Ablauf der Intervention**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Intervention (Verbrennungstrauma / Scheintrauma) gegliedert in vorbereitende Schritte, die Intervention und die Nachsorge; Zeitintervalle nicht maßstabsgetreu dargestellt.

7.6.3 Scheinintervention

Mit Ausnahme der Immersion in das heiße Wasser wurde der Prozess der Verbrennungstrauma-Gruppe analog eingehalten. So wurden Versuchstiere der Scheinintervention ebenfalls in der Haltung fixiert, 9s belassen und mit einer mit 1 ml einer 0,9% Kochsalzlösung i.p. versorgt.

7.6.4 Euthanasie

Nach Beendigung der Beobachtungszeit von 1h wurden die Versuchstiere mittels CO₂-Inhalation unter Narkose in einem abgeschlossen Plastikbehälter euthanasiert und der vollständige Kreislaufstillstand wurde bestätigt.

7.7 Messung der Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

Um die Auswirkung des immunologischen Stimulus auf die Aktivität der CD4⁺ Tregs zu messen, wurde - wie im Folgenden detailliert beschrieben - nach einer standardisierten Gewebeaufbereitung ein Färbungsprotokoll durchlaufen und anschließend eine phosphodurchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

7.7.1 Gewebeaufbereitung

Es wurden die, das Verletzungsareal drainierenden Lymphknoten als Ort der lokalen posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs durch eine spezielle chirurgische Technik entnommen. Zusätzlich wurde die Milz als Ort der systemischen Aktivierung explantiert und die Zellen aus den jeweiligen Geweben isoliert.

7.7.1.1 Präparation

Die narkotisierten Versuchstiere wurden auf einer Operationsplatte mit Spritzenkanülen an den von sich gestreckten Vorder- und Hinterläufen auf dem Rücken liegend fixiert, um das bauchseitige Operationsgebiet zu exponieren. Es wurde einen zentralen Hautschnitt von Unterbauch bis zum Hals gesetzt und durch Hautschnitte entlang der Extremitäten bis zu den Pfoten erweitert, um gute Entnahmebedingungen für das Gewebe zu gewährleisten. Die thorakale und abdominale Haut wurde anschließend seitlich auf einer Operationsplatte mit Nadeln fixiert. Es wurden die drainierenden Lymphknoten für das Gebiet des (Schein-)Traumas - axillär, brachial und inguinal (Hanschen, Tajima et al. 2011)- präpariert und atraumatisch entnommen. Anschließend wurde das Peritoneum linksseitig eröffnet und die Milz an ihrer bindegewebigen Aufhängung atraumatisch explantiert. Alle entnommenen Gewebe wurden in einem C5-Kulturmedium (Temperatur: 1-4°C) in einem 5 ml Eppendorfcup auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

7.7.1.2 Zellisolation

Anschließend durchlief das entnommene Gewebe ein Isolationsverfahren zur Zellgewinnung. Das Gewebe wurde in einer Petrischale mit dem gummierten Stempel einer 20 ml-Spritze durch ein Metallsieb mit einem Porendurchmesser von 0,45 mm gedrückt, um das Gewebe zu zerkleinern. Das gesiebte Material wurde jeweils in 2 ml C5-Kulturmedium suspendiert. Es erfolgten mehrere Durchläufe, um die maximale

Anzahl an Zellen zu gewinnen. Die Suspension wurde anschließend in einem 15 ml fassenden FalconTM Tube gesammelt.

Die Zellsuspensionen wurden nach einem Aufreinigungsdurchgang bestehend aus einer zehn minütigen Zentrifugation mit einer Umdrehungszahl von 12000 RPM (engl. *rotations per minute*, dt. Umdrehungen pro Minute) und Verwerfen des nicht-zellulären Überstandes aufgereinigt. Die Milzsuspension wurde mit jeweils 5 ml einen JL-Lyse-Puffers (Zusammensetzung siehe Reagenzien) für 5 min inkubiert. Die Lyse wurde nach 5 min durch Hinzufügen von 5 ml C5-Puffer gestoppt. Nach einem weiteren Aufreinigungsdurchgang wurden beide Gewebesuspensionen mit einem FalconTM Zellenfilter der Porengröße 70 µm gefiltert, um die Bindegewebeanteile aus der Suspension zu exkludieren. Die entstehenden Zellsuspensionen wurden auf 96-well-Platten in einer Aufteilung von sechs Wells pro individueller Probe verteilt. Final erfolgte eine Fixation der Zellen durch Zugabe von 0,15%igem PFA.

7.7.2 Phospho-Durchflusszytometrie

Der Aktivitätszustand der CD4⁺ Tregs wurde im Anschluss über eine phospho-durchflusszytometrische Technik bestimmt. Im Folgenden findet sich eine detaillierte Beschreibung des Prinzips, der Färbung und der Auswertung dieser Methode.

7.7.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen basieren auf der Emission von optischen Signalen durch die Zelle bei Passage eines Laserstrahls. Die Signale jeder einzelnen Zelle einer Probe werden über verschiedene, durch Filter getrennte Detektoren, individuell erfasst. Es werden über Streulicht, das Vorwärtstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) und das Seitwärtstreulicht (engl. *side scatter*, SSC), quantitative Informationen über Größe und Granularität der Zelle erfasst. Des Weiteren können die Zellen durch Antikörper, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind, gebunden und somit „gefärbt“ werden. Über den gleichzeitigen Einsatz verschiedenfarbiger Laser und unterschiedlicher Farbstoffe und Filter werden so verschiedene Informationen über die Zelle erhoben.

Eine spezielle Form der Durchflusszytometrie, die Phospho-Durchflusszytometrie, basiert auf einer antikörperbasierten Erkennung der Phosphorylierung, einer posttranslationalen Modifikation bei Zellaktivierung. Phospho-spezifische Antikörper erkennen somit spezifisch ein durch Phosphorylierung verändertes Protein und bietet somit eine zusätzliche Möglichkeit der Informationsgewinnung. Speziell wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer antikörperbasierten Anfärbung der intrazellulären

Signaltransduktionsmoleküle ZAP-70 und PKC- θ und deren phosphorylierten Versionen gearbeitet.

7.7.2.2 Färbeprotokoll

Um die Aktivität der CD4⁺ Tregs in der Phospho-Durchflusszytometrie zu messen, durchliefen die - wie in 7.7.1 beschrieben - aufgereinigten Zellen vorbereitend ein spezifisches Färbeprotokoll.

Die PFA-fixierten Zellen wurden nach Zentrifugation, Verwerfen des nicht-zellulären Überstands und Auflockerung des Zell-Pellets durch die Zugabe von 4°C temperierten Methanol für eine Dauer von zehn Minuten permeabilisiert. Nach Zentrifugation wurde ein Waschvorgang mit PBA durchgeführt. Durch eine subsequente 15- minütige Inkubation mit einem Fc-Block-Antikörper (siehe 7.3.2) bei Raumtemperatur wurde eine falsch-positive Bindung der Antikörper an den Fc-Rezeptoren statt der der Antikörper-spezifischen Fab-Domäne der Immunzellen verhindert.

Zur Identifikation der CD4⁺ Tregs, des Zelltyps von Interesse, wurden der T-Helfer-Zell-spezifische CD4-Rezeptor und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 angefärbt. Demnach wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit Antikörpern gegen diese Moleküle angefärbt: Zum einen mit Antikörper reaktiv gegen den CD4-Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche, der mit einem Allophycocyanin (APC)-Farbstoff konjugiert ist (siehe 7.3.2), zum anderen mit Antikörper reaktiv gegen den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3, der mit einem Fluorescein (FITC)-Farbstoff konjugiert ist (siehe 7.3.2). Zusätzlich wurden die Zellen im selben Schritt mit Antikörpern gegen die intrazellulären Stoffwechsellmoleküle ZAP-70 und PKC- θ und deren phosphorylierte Versionen (siehe 7.3.2) inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBA und Zentrifugation wurden die Zellen mit dem intrazellulären konjugierten sekundären Antikörper Alexa Fluor 555 (siehe 7.3.2) bei Raumtemperatur 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nach zwei Zentrifugationen und weiteren Waschvorgängen mit PBA erfolgte eine Fixation der Zellen mit 0,3% PFA. Anschließend wurden die Zellen nach Zentrifugation mit PBS resuspendiert und mit dem MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) phospho-durchflusszytometrisch vermessen.

7.7.2.3 Identifikation der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

In der durchflusszytometrischen Datenanalyse mit FlowJo v.10 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA) wurde eine spezielle „Gating“-Strategie, d.h. die Anwendung spezifischer Filter zu Erkennung eines speziellen Zell-Subtyps, zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten verwendet, um die Aktivität der CD4⁺ Tregs zu bewerten. Im Analyse-Interface wurde in einem Graph mit den Achsen SSC und FSC sowie ein Gate der lebenden Zellen (Live-Gate) erstellt und Zell-Debris ausgeschlossen. Über ein singlet-Gating in einem Graph mit den Achsen FSC-A und FSC-H wurde die Analyse auf einzeln lokalisierte Zellen limitiert und Zelldoubletten exkludiert. Über den APC-Farbstoff wurden die mit dem APC-gekoppelten anti-CD4-Rezeptor-Antikörper markierten CD4⁺ T-Zellen identifiziert. Über das FITC-Fluorochrom wurden in einem weiteren Gate die mit dem FITC-gekoppelten anti-FoxP3-Antikörper markierten CD4⁺ Tregs identifiziert. Die Aktivität der CD4⁺ Tregs wurde über ein Gate für Phycoerythrin-A (PE-A) in der Live⁺, singlet⁺, APC-high, FITC-high (CD4⁺ Treg) Population gemessen und über ein Histogramm wurde die mediane Fluoreszenzintensität quantitativ ermittelt. Eine detaillierte Darstellung des Gatings erfolgt in Abbildung 8.

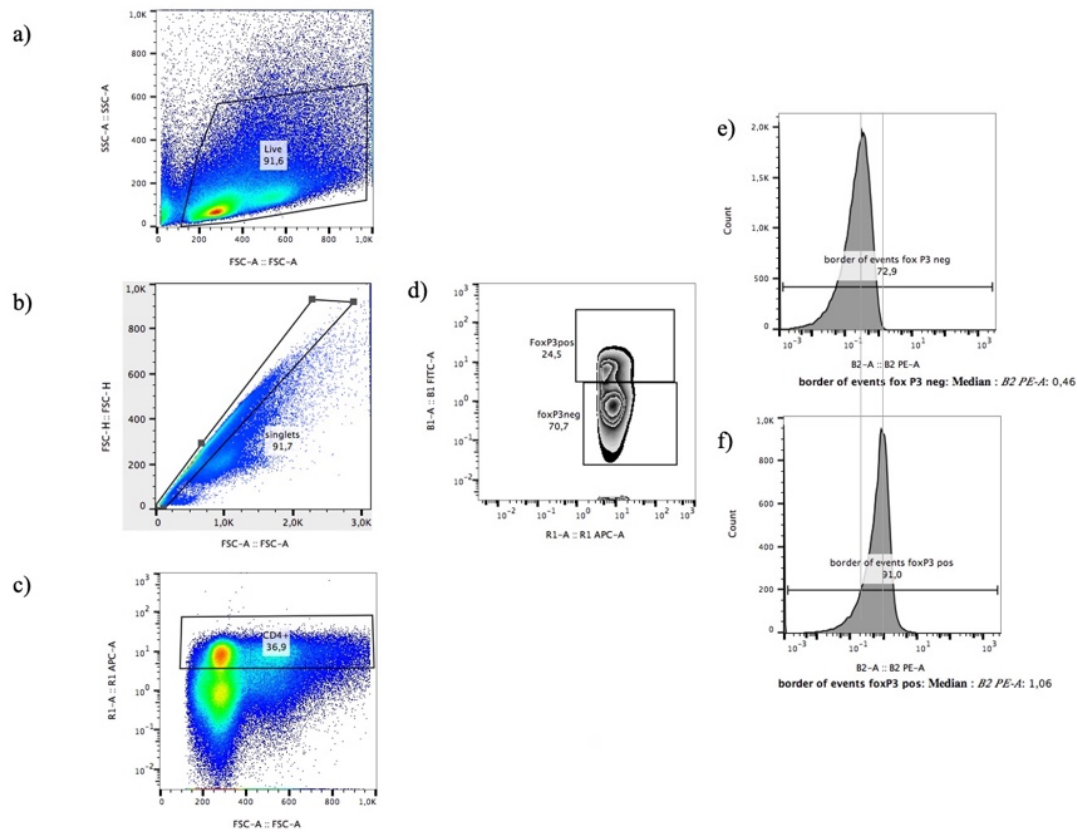


Abbildung 8 Gating-Strategie

Dargestellt ist die Gating-Strategie zur Messung des Fluoreszenzsignals der CD4⁺ Treg-Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ . In einem ersten Schritt wurden die lebenden Zellen in einer Darstellung von FSC-A und SSC-A vom Zelldebris isoliert, siehe (a). Anschließend wurden durch singlet-Gating im FSC-A und FSC-H Fenster Einzelzellen isoliert und Zelldoubletten verworfen (b). Im nächsten Schritt wurden CD4⁺ T-Zellen in einem Graph aus FSC-A und R1 APC-A identifiziert - hier im „CD4⁺“-Gate (c). Die CD4⁺ Tregs wurden in einer Darstellung von R1 APC-A und B1 FITC-A von den CD4⁺ T-Effektorzellen isoliert - hier im „FoxP3pos“-Gate. In einem letzten Analyseschritt wurde die Fluoreszenzintensität der signaltransduzierenden Moleküle (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ als Histogramm dargestellt – hier exemplarisch für Proben von einem Versuchstier mit Scheintrauma (e) und Verbrennungstrauma (f). Zudem wird hier exemplarisch der Unterschied der medianen Fluoreszenzintensität zwischen e) und f) dargestellt.

Die Beschriftung „border of events foxP3 pos“ ist durch die Visualisierungssoftware FlowJo v.10 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon) bedingt, welches eine Definition der Gruppe der Datenpunkte zur Darstellung im Histogramm erfordert und stellt keine gesonderte Gruppe dar.

Als methodische Exklusionskriterien für die durchflusszytometrische Analyse wurden definiert: Prozentsatz der lebenden Zellen <60% (indikativ für verunreinigte Probe), fehlende Differenzierbarkeit in der der CD4- und FoxP3-Antikörper-Färbung im Gating-Prozess (indikativ für mangelhafte Färbung) und das Vorhandensein einer Antikörperfärbung in der ungefärbten Kontrolle (indikativ für mangelhaften Färbungsprozess, Unmöglichkeit der Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität).

7.7.2.4 Relative Fluoreszenzintensität

In der Etablierung der Methodik für diese Dissertationsarbeit wurde beobachtet, dass die Level der interindividuell unterschiedlichen Autofluoreszenz zwischen den Versuchstieren mit dem Level der intraindividuellen Fluoreszenzsignale der antikörpergefärbten Proben korrelieren, grafisch dargestellt in Abbildung 9.

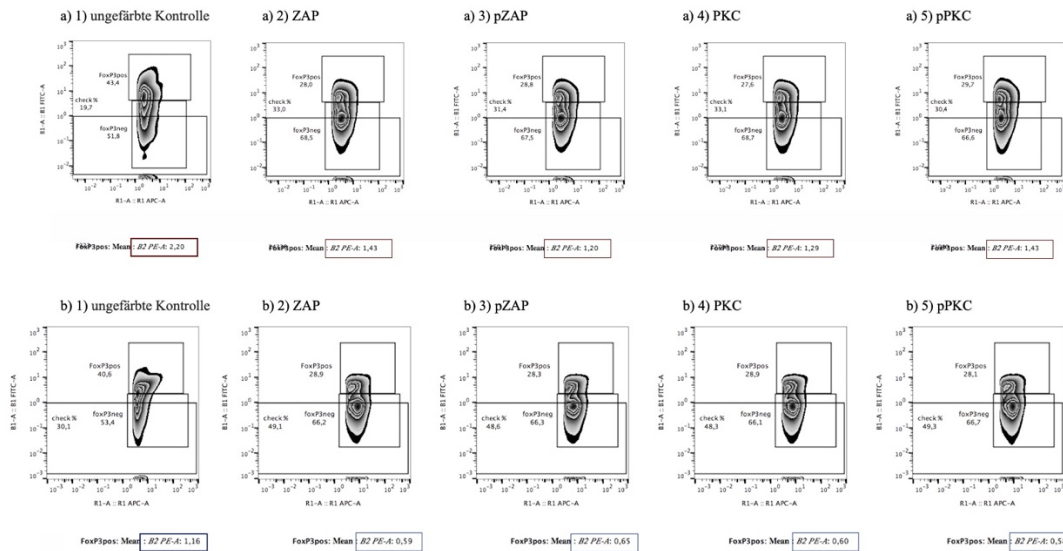


Abbildung 9 Die Höhe der Autofluoreszenz einer Probe korreliert mit der Stärke des Fluoreszenzsignals der CD4+ Tregs

Exemplarisch dargestellt sind die Fluoreszenzmessungen aus Proben aus Lymphknotengewebe zwei verschiedener Versuchstiere a) und b). Die Nummerierung 1 identifiziert die ungefärbte Kontrolle, 2-5 beschreibt jeweils das angefärbte Signalmolekül. Zusätzlich sind unter den Graphen die Ergebnisse der Fluoreszenzintensitätsmessung der CD4+ Treg-Population gegeben; für die ungefärbte Kontrolle beschreibt dieser Wert die Autofluoreszenz. Es fällt auf, dass die Autofluoreszenz sich zwischen Versuchstier a) und b) unterscheidet. Analog unterscheiden sich auch die Level der zugehörigen angefärbten Proben.

Bei allen Vorkehrungen die Bedingungen zu normieren – unterliegen die Proben minimal unterschiedlichen Einflüssen bei Temperatur, Lichtexposition, Gewebeanteil, Inkubationszeit mit Antikörpern, Zeitpunkt der Entnahme, Zeitpunkt der durchflusstzytometrischen Messung, et cetera. Dies führt zu interindividuell unterschiedlichen Autofluoreszenzintensitäten mit einer intraindividuellen Konstanz.

Um diesem Befund gerecht zu werden und die Messergebnisse weiter zu standardisieren wurde Normierung durchgeführt. In diesem weiteren Analyse-Schritt wurden die Ergebnisse mittels Microsoft Excel v16.23 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington) auf eine adjustierte relative Fluoreszenzintensität (RFI) der CD4+ Tregs normiert, um eine Vergleichbarkeit ohne die Einflüsse von Autofluoreszenz zu

gewährleisten. Dafür wurden die Proben eines Versuchstieres jeweils auf die Autofluoreszenz der jeweiligen ungefärbten Kontrollprobe adjustiert. Hierfür wurde davon ausgegangen, dass die Autofluoreszenz jeder ungefärbten Kontrolle gleich gewichtet wird: $MFI_{\text{ungefärbte Kontrolle}} \triangleq 1$. Die RFI der intrazellulär gefärbten Proben wurde wie folgt berechnet:

$$RFI_{\text{intrazellulär gefärbte Probe}} = MFI_{\text{intrazellulär gefärbte Probe}} / MFI_{\text{ungefärbte Kontrolle}}$$

Formel 1

7.7.2.5 Zielparameter

Verschiedene funktionelle Zielparameter der CD4⁺ Tregs wurden zwischen Wildtypkontrollgruppe und Gen-Knockoutgruppen verglichen. Die *Baseline-Aktivität* der CD4⁺ Tregs wurde als Aktivität der CD4⁺ Tregs nach Scheinintervention definiert. Die Level der *posttraumatischenn Aktivität* der CD4⁺ Tregs wurde als RFI-Messwert der CD4⁺ Treg-Population nach Trauma definiert. Die *posttraumatische Aktivierung* wurde als Unterschied zwischen Aktivität der CD4⁺ Tregs nach Scheinintervention und Trauma definiert.

Zur *quantitativen Aktivierungsmessung* wurde ein Durchschnitt der Ergebnisse der durchflusszytometrischen CD4⁺ Treg-Aktivitätsmessung eines Signalmoleküls (ZAP, pZAP, PKC, pPKC) aller getesteten Tiere einer Gruppe gebildet ($\emptyset RFI$). Als Gruppen für die Berechnung wurden die Wildtyp- und Gen-Knockoutgruppen, jeweils unterteilt in einen Scheininterventions-Studienarm und einen Trauma-Studienarm definiert. Als absoluter quantitativer Parameter der CD4⁺ Treg-Aktivierung wurde der Unterschied zwischen Scheintrauma und Verbrennungstrauma (ΔRFI) wie folgt berechnet:

$$\Delta RFI = \emptyset RFI_{\text{Verbrennungstrauma}} - \emptyset RFI_{\text{Scheintrauma}}$$

Formel 2

Als relativer quantitativer Parameter der CD4⁺ Treg-Aktivierung unabhängig von der absoluten Höhe der Ausgangswerte wurde der Unterschied zwischen Scheintrauma und Verbrennungstrauma (ΔRFI) wie folgt berechnet:

$$\text{posttraumatische Aktivierung} = (\emptyset RFI_{\text{Verbrennungstrauma}} / \emptyset RFI_{\text{Scheintrauma}}) - 1$$

Formel 3

Das Ergebnis wurde in % angegeben. Diese quantitativen CD4⁺ Treg-Aktivierungswerte wurden unter Berücksichtigung der statistischen Analyse zwischen den verschiedenen

Gruppen miteinander verglichen, um eine Aussage über das CD4⁺ Treg Aktivierungsverhalten und den biologischen Effekt einer Disruption von CD40L und P-Selektin nach Trauma zu erhalten.

7.7.2.6 CD4⁺ Treg-Verteilungsverhalten

Das Verteilungsverhalten der CD4⁺ Tregs zwischen peripherem (Lymphknoten) und zentralem lymphatischem Gewebe (Milz) wurde zwischen den Wildtyp- und Gen-Knockoutgruppen verglichen. Für jede Gruppe wurde der Prozentsatz der CD4⁺ Treg-Zahlen in der Milz und den Lymphknoten (Gewebe) bezogen auf die Gesamtpopulation wie folgt berechnet:

$$\text{CD4}^+ \text{ Treg-Anteil}_{\text{Gewebe}} = \text{Zellzahl CD4}^+ \text{ Tregs}_{\text{Gewebe}} / \text{Zellzahl CD4}^+ \text{ Tregs}_{\text{Gesamt}}$$

Formel 4

Der CD4⁺ Treg-Anteil in Milz und Lymphknoten wurde zwischen Scheininterventions-Studienarm und dem Trauma-Studienarm verglichen und Veränderungen der Balance wurden analysiert.

7.8 Messung der hämostatischen Parameter

Um die Aktivierung und hämostatische Funktion der Thrombozyten in Abhängigkeit der CD40L- und P-Selektin-abhängigen Signalwege zu messen, wurde eine Blutprobe der Versuchstiere rotationsthromboelastometrisch mittels ROTEM®delta untersucht und zwischen Kontrollgruppe und Gen-Knockoutgruppen verglichen.

7.8.1 Blutentnahme

Direkt nach der Euthanasie erfolgte eine intrakardiale Blutentnahme. Über einen medianen Stichkanal unter dem Xiphoid in kranialer Ausrichtung wurde unter leichter Aspiration einer der Ventrikel der Versuchstiere mit einer 1 ml Spritze auf einer 14G-Kanüle punktiert. Die Kanüle war zuvor mit 10 µl Citratlösung präpariert worden, um eine Koagulation zu verhindern. Eine minimale Entnahmemenge von 100 µl Vollblut wurde festgelegt, um ein standardisiertes Blut/Citrat Verhältnis von 10:1 zu gewährleisten. Bei größeren Entnahmemengen wurden Citrat verhältnismäßig hinzugegeben, um das angestrebte Konzentrationsverhältnis zu erhalten.

7.8.2 Rotationsthromboelastometrie

Die Blutproben wurden im Anschluss an die Entnahme sofort auf Körpertemperatur (36°C) gelagert und einer rotationsthromboelastometrischen Analyse zugeführt.

7.8.2.1 Prinzip der Rotationsthromboelastometrie

In der Rotationsthromboelastometrie wird die Blutprobe nach Initiation der Gerinnung des Citratbluts über die Zugabe von Calcium und Gerinnungsaktivatoren mit einem rotierenden Stempel in Kontakt gebracht. Bei Koagulations- sowie Fibrinolyseprozessen ändert sich der Widerstand des rotierenden Stempels in der Blutprobe und diese Information wird grafisch auf einer Gerinnungskurve über die Zeit aufgetragen und quantitativ anhand definierter Messpunkte analysiert. Basierend auf diesen Daten können verschiedene Gerinnungsparameter bestimmt werden, siehe 7.8.2.3.

7.8.2.2 Anwendung der Rotationsthromboelastometrie

Für die rotationsthromboelastometrische Untersuchung muriner Proben wurde das für humane Patienten klinisch zugelassene ROTEM[®] delta mit dem für experimentellen Einsatz hergestellten Cup&Pin mini[®]-Set (=Gefäß und Stempel-Set) verwendet (siehe 7.5). In einem ersten Schritt wurden die Cups (Gefäße) im passenden Küvettenhalter fixiert. Im Folgenden wurden die Plastik-Pins (Stempel) auf dem metallischen Rotationsstab befestigt, welcher an die elektronische Widerstands-Messeinheit des Geräts angeschlossen ist. Es wurden jeweils 7 µl Calcium-Reagenz (star-tem[®]) und Gewebefaktor (ex-tem[®]) in den Cup gegeben und mit 105 µl murinem Citratblut versetzt und vermischt. Der Cup wurde über eine Führungsrinne mit dem am Metallstempel befestigten Pin in Kontakt gebracht und der Cup magnetisch fixiert. Ein ROTEM[®] *ex-tem* Programm wurde sofort im Anschluss gestartet und die Messungen in Echtzeit Plausibilitätschecks unterworfen.

7.8.2.3 Rotationselastometrische Parameter

Die analysierten ROTEM[®]-Parameter inkludieren die Gerinnungszeit (engl. *clotting time*; CT), die Gerinnselbildungszeit (engl. *clot formation time*, CFT), den α -Winkel und die maximale Gerinnungsfestigkeit (engl. *maximum clot firmness*, MCF).

Die CT beschreibt die Zeit, bis eine Gerinnselbildung mit einer Amplitude von 2 mm gemessen wird - dies wird als Zeitpunkt definiert, an dem die Gerinnung beginnt. Die CFT definiert die Latenz vom Beginn der Gerinnung bis zum Erreichen einer definierten Gerinnungsfestigkeit (Messung einer Amplitude von 20 mm). Der α -Winkel definiert den

Winkel einer Tangente zur Steigung des Gerinnungsgraphen, ausgehend vom Beginn der Gerinnung. α -Winkel und CFT Zusammen stellen Indikatoren für die Geschwindigkeit der Gerinnung dar. Eine schnelle Gerinnungsbildung ist durch eine kurze CFT und einen steilen α -Winkel gekennzeichnet. Die MCF ist definiert als die maximale Breite des Gerinnungsdiagramms, die die maximale Festigkeit des Gerinnsels widerspiegelt und als Indikator für die Gerinnungsqualität und -stärke der Thrombozyten dient (Whiting and DiNardo 2014). Von den gemessenen Parameter basiert zudem v.a. die CFT auf der Thrombozytenfunktion für den Aufbau eines Gerinnungs-Clots (Calatzis, Spannagl et al. 2013).

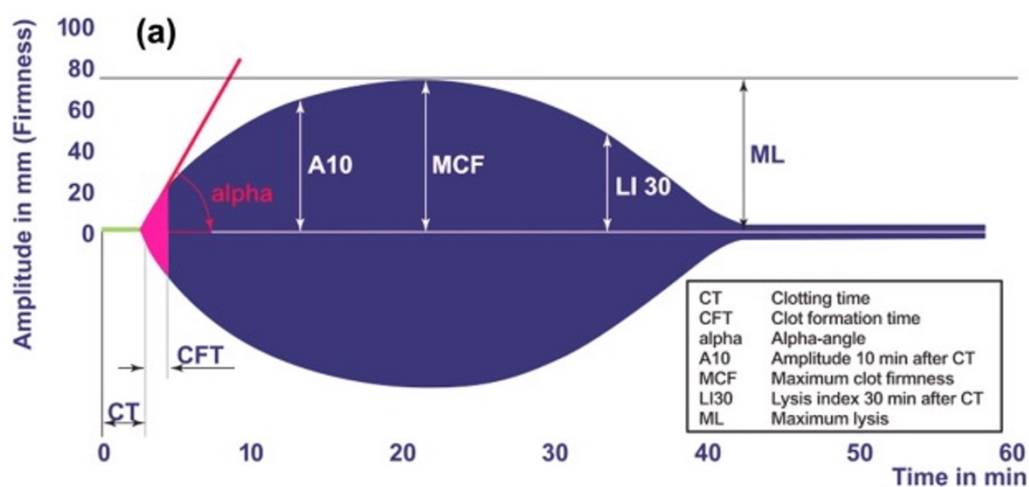


Abbildung 10 **ROTEM®-Parameter**

Grafische Darstellung der Gerinnungskurve mit den ROTEM® Messparametern Gerinnungszeit (CT), Gerinnungsbildungszeit (CFT), α -Winkel und maximale Gerinnungsfestigkeit (MCF). Eine genaue Beschreibung der Parameter erfolgt in 7.8.2.3. [Grafik aus (Whiting and DiNardo 2014) Reprinted by permission of John Wiley and Sons: Whiting, D. and J.A. DiNardo, TEG and ROTEM: technology and clinical applications. Am J Hematol, 2014. 89(2): p. 228-32. copyright © 1999-2020 John Wiley & Sons, Inc., licensing number 4813720212572.

Als methodisches Exklusionskriterium für Ergebnisse der rotationsthromboelastometrischen Messung wurde ein makroskopisch erkennbares Gerinnen der Vollblut-Citrat-Probe vor Beginn der thromboelastometrischen Messung definiert.

7.9 Versuchsprotokolle

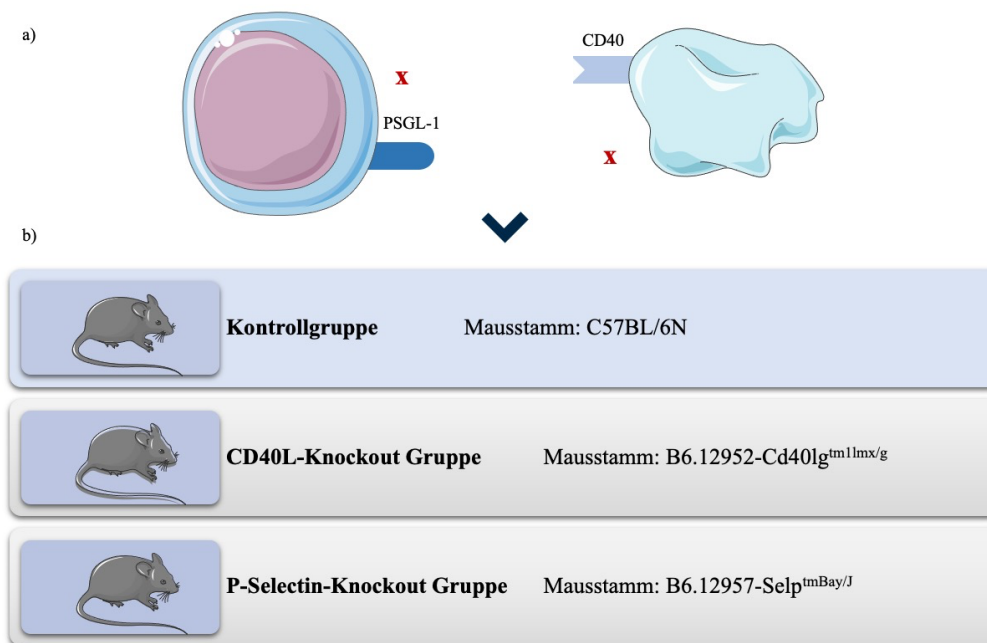


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Hypothesen und der eingesetzten Studienarme

a) Schematisch dargestellt sind die in der Dissertation untersuchten Hypothesen: Ein Genknockout – respektive P-Selektin (thrombozytär) oder CD40L (CD4⁺ Treg basiert) – resultiert in einer Beeinträchtigung der Interaktion von Thrombozyten und CD4⁺ Tregs.

b) Dargestellt sind die verschiedenen eingesetzten Studienarme zur Untersuchung der Hypothesen dieser Dissertation. Verglichen mit einer Kontrollgruppe wurden CD4⁺ Treg-Funktion und Rotationsthromboelastometrieparameter in CD40L- und P-Selektin-Genknockout-Gruppen miteinander verglichen.

7.9.1 Validation des Knockout-Modells für die Arbeit

Die Forschungsfragen zur Rolle von CD40L und P-Selektin in der Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten wurde in dieser Dissertationsarbeit in einem murinen Genknockout-Modell untersucht. Die Literatur propagiert sowohl CD40L als auch P-Selektin als wichtige Signalmoleküle für die Entwicklung der CD4⁺ Tregs (Kohm and Miller 2003, Guiducci, Valzasina et al. 2005, Spence and Green 2008). Um die Aussagekraft einer Untersuchung der CD4⁺ Tregs bei entsprechender Gen-Defizienz zu gewährleisten, wurde das das Knockout-Modell in einem ersten Schritt für die geplante Testung der Hypothesen validiert. In diesem Prozess wurden die Zellpopulationen, im Speziellen die CD4⁺ Treg-Subpopulation, für die verschiedenen Geweben durchflusszytometrisch untersucht.

7.9.1.1 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

In der Validierung wurden die Ergebnisse der CD4⁺ Treg-Analyse, beschrieben in 7.7, sowie deren Versuchsgruppenaufbau (siehe 7.9: Wildtyp Kontrollgruppe, P-Selektin^{KO} Gruppe, CD40L^{KO} Gruppe) und Versuchsablauf (siehe 7.7: CD4⁺ Treg-Aktivitätsmessung mittels Phospho-Durchflusszytometrie) verwendet.

7.9.1.2 Untersuchte Parameter

Zuerst wurde überprüft, wie sich die Gesamtzellzahl bei Gen-Knockout im Vergleich zu Wildtyptieren verändert. In einem weiteren Schritt wurde analysiert, wie sich die Zellzahl der CD4⁺ Treg-Population bei Gen-Knockout im Vergleich zu Wildtyptieren verändert.

Im Anschluss wurde analysiert, wie sich der Anteil CD4⁺ Treg-Population an der Gesamtpopulation bei Gen-Knockout im Vergleich zu Wildtyptieren verändert.

Das Fehlen einer CD4⁺ Treg-Population wurde als Exklusionskriterium der Gen-Knockout-Gruppe für die Arbeit definiert.

7.9.2 Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei Wildtyptieren

Als Basis für die folgenden Gen-Knockout-Untersuchungen wurde zuerst das frühe posttraumatische Aktivierungsverhalten der CD4⁺ Tregs in einer Wildtypkontrollgruppe analysiert. Das Aktivierungsverhalten der CD4⁺ Tregs wurde, wie in 7.7 beschrieben, an der gesteigerten Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ phospho-durchflusszytometrisch untersucht.

Eine frühe posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs in Wildtyp-Mäusen wurde schon in vorhergehenden Studien gezeigt (Hanschen, Tajima et al. 2011, Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018). Die Untersuchung der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs in der Kontrollgruppe wurde in dieser Dissertationsarbeit erneut durchgeführt, um durch ein exakt gleiches Protokoll, gleiche Untersucher und gleiche Rahmenbedingungen die bestmögliche Vergleichbarkeit der Studienarme zu gewährleisten.

7.9.2.1 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere, männliche 8-10 Wochen alte C57BL/6N Wild-Typ-Mäuse (siehe 7.2), wurden zwischen einer Verbrennungsintervention und einer Scheinintervention randomisiert.

Tabelle 6 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei Wildtyptieren

Versuchstiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppengröße
Wildtyp	C57BL/6N	Scheinintervention	1h	n=16
Wildtyp	C57BL/6N	Verbrennungsintervention	1h	n=16

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.2.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 7.6 beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (7.6.1) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (7.6.2 oder 7.6.3) unterzogen. Basierend auf Voruntersuchungen einer murinen in-vivo Studie von Hanschen und Koautoren zur Kinetik der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs (Hanschen, Tajima et al. 2011) wurde in dieser Studie 60 min nach Trauma oder Scheinintervention - nach Euthanasie (siehe 7.6.4) - eine phosphodurchflusszytometrische Messung der Aktivierung der CD4⁺ Tregs durchgeführt (siehe 7.7.2).

7.9.3 Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L-Gendefizienz

Um die Bedeutung von CD40L für die frühe posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs bewerten zu können, wurde eine CD40L gen-defiziente Gruppe demselben Protokoll unterworfen wie die Wildtypkontrollgruppe (siehe 7.9.2) und im Anschluss verglichen.

7.9.3.1 Versuchsgruppen

Es wurden 8-10 Wochen alte B6.12952-Cd40l^{tm1lmx/g} Tiere, Mäuse mit Gen-Defizienz für CD40L mit einem C57BL/6N Hintergrund zwischen einer Verbrennungs- und einer Scheininterventionsgruppe randomisiert.

Tabelle 7 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L-Gendefizienz

Versuchstiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppengröße
CD40L ^{KO}	B6.12952-Cd40l ^{tm1lmx/g}	Scheinintervention	1h	n=8
CD40L ^{KO}	B6.12952-Cd40l ^{tm1lmx/g}	Verbrennungsintervention	1h	n=8

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.3.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 7.6 beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (7.6.1) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (7.6.2 oder 7.6.3) unterzogen. 60 min nach Trauma oder Scheinintervention wurde, nach Euthanasie (siehe 7.6.4), eine phospho-durchflusszytometrische Messung der Aktivierung der CD4⁺ Tregs durchgeführt (siehe 5.7.).

7.9.4 Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz

Um die Bedeutung von P-Selektin für die frühe posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs bewerten zu können, wurde eine P-Selektin gen-defiziente Gruppe demselben Protokoll unterworfen wie die Wildtypkontrollgruppe (siehe 5.9.1.) und im Anschluss verglichen.

7.9.4.1 Versuchsgruppen

Es wurden 8-10 Wochen alte B6.12952-Cd40lg^{tm1lmx/g} Tiere, Mäuse mit Gen-Defizienz für CD40L mit einem C57BL/6N Hintergrund zwischen einer Verbrennungs- und einer Scheininterventionsgruppe randomisiert. Da intraoperativ eine erhöhte Blutungsneigung der P-Selektin-defizienten Tiere beobachtet wurde, wurde sich für eine Stärkung Verbrennungsgruppe entschieden, da diese durch das Trauma für eine erhöhte Mortalität prädisponiert waren.

Tabelle 8 Versuchsgruppen für Phospho-Durchflusszytometrie der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz

Versuchstiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppengröße
P-Sel ^{KO}	B6.12957-SelptmBay/J	Scheinintervention	1h	n=7
P-Sel ^{KO}	B6.12957-SelptmBay/J	Verbrennungsintervention	1h	n=9

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.4.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 5.6. beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (5.6.1.) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (5.6.2. oder 5.6.3.) unterzogen. 60 min nach Trauma oder Scheinintervention wurde, nach Euthanasie (siehe 7.6.4) - eine phospho-durchflusszytometrische Messung der Aktivierung der CD4⁺ Tregs durchgeführt (siehe 7.7.2).

7.9.5 Rotationsthromboelastometrie in Wildtyptieren

Im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit sollte ein Verständnis über den direkten Zellkontakt als Mechanismus einer reziproken Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten generiert werden. Deswegen wurde zusätzlich zum Aktivierungsverhaltens der CD4⁺ Tregs die Aktivierung und Funktion der Thrombozyten nach Trauma untersucht, um einen Einblick in thrombozytäre Komponente der Interaktion zu generieren. Die Analyse der thrombozytären Reaktion auf Trauma in C57BL/6N Wildtyptieren bildete die Grundlage für Untersuchungen an Gen-Knockout-Gruppen, um eine Kontrollgruppe im Sinne der der bestmöglichen untersucherunabhängigen Vergleichbarkeit zu etablieren.

7.9.5.1 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere, männliche 8-10 Wochen alte C57BL/6N Wild-Typ-Mäuse (siehe 7.2) wurden zwischen einer Verbrennungsintervention und einer Scheinintervention randomisiert.

Tabelle 9 Versuchsgruppen für Rotationsthromboelastometrie in Wildtyptieren

Versuchstiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppen- größe
Wildtyp	C57BL/6N	Scheinintervention	1h	n=16
Wildtyp	C57BL/6N	Verbrennungsintervention	1h	n=16

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.5.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 7.6 beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (7.6.1) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (7.6.2 oder 7.6.3) unterzogen. 60 min nach Trauma oder Scheinintervention wurde, nach Euthanasie (siehe 7.6.4). Das Blut wurde daraufhin einer rotationsthromboelastometrischen Untersuchung mit ROTEM® delta unterzogen (siehe 7.8.2). Die C57BL/6N Wildtyp-Gruppe wurde als Kontrollgruppe für den Gen-Knockout-Gruppen definiert.

7.9.6 Rotationsthromboelastometrie bei CD40-Gendefizienz

Um die Bedeutung von CD40L für die prä- und posttraumatische hämostatische Funktion bewerten zu können, wurde eine für CD40L gen-defiziente Gruppe demselben Protokoll unterworfen wie die Wildtypkontrollgruppe (siehe 7.9.5) und im Anschluss verglichen.

7.9.6.1 Versuchsgruppen

Es wurden 8-10 Wochen alte B6.12952-Cd40l^{tm1lmx/g} Tiere, Mäuse mit Gen-Defizienz für CD40L mit einem C57BL/6N Hintergrund (siehe 7.2), zwischen einer Verbrennungs- und einer Scheininterventionsgruppe randomisiert.

Tabelle 10 Versuchsgruppen für Rotationsthromboelastometrie bei CD40-Gendefizienz

Versuchs- tiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppen- größe
CD40L ^{KO}	B6.12952- Cd40l ^{tm1lmx/g}	Scheinintervention	1h	n=8
CD40L ^{KO}	B6.12952- Cd40l ^{tm1lmx/g}	Verbrennungsintervention	1h	n=8

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.6.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 7.6 beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (7.6.1) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (7.6.2 oder 7.6.3) unterzogen. 60 min nach Trauma oder Scheinintervention wurde, nach Euthanasie (siehe 7.6.4). Das Blut wurde daraufhin einer rotationsthromboelastometrischen Untersuchung mit ROTEM® delta unterzogen (siehe 7.8.2).

7.9.7 Rotationsthromboelastometrie bei P-Selektin Gendefizienz

Um die Bedeutung von P-Selektin für die prä- und posttraumatische hämostatische Funktion bewerten zu können, wurde eine, für P-Selektin gen-defiziente, Gruppe demselben Protokoll unterworfen wie die Wildtypkontrollgruppe (siehe 7.9.5) und im Anschluss verglichen.

7.9.7.1 Versuchsgruppen

Es wurden 8-10 Wochen alte B6.12952-Cd40lg^{tm1lmx/g} Tiere, Mäuse mit Gen-Defizienz für CD40L mit einem C57BL/6N Hintergrund (siehe 7.2), zwischen einer Verbrennungs- und einer Scheininterventionsgruppe randomisiert. Da intraoperativ eine erhöhte Blutungsneigung der P-Selektin-defizienten Tiere beobachtet wurde, wurde eine Aufstockung der Verbrennungsgruppe entschieden, da diese durch das Trauma für eine erhöhte Mortalität prädisponiert waren.

Tabelle 11 Versuchsgruppen für Rotationsthemboelastometrie bei P-Selektin Gendefizienz

Versuchstiere	Mausstamm	Intervention	Zeit bis Euthanasie	Gruppengröße
P-Sel ^{KO}	B6.12957-SelptmBay/J	Scheinintervention	1h	n=7
P-Sel ^{KO}	B6.12957-SelptmBay/J	Verbrennungsintervention	1h	n=9

Dargestellt sind die verschiedenen Studienarme mit dem jeweiligen Versuchstier-Typ, der jeweilige Mausstamm und die jeweils durchgeführte Intervention pro Studiengruppe, sowie Angaben zum Zeitintervall zwischen Intervention und Euthanasie und der Gruppengröße.

7.9.7.2 Versuchsablauf

Die beiden Gruppen wurden nach der in 7.6 beschriebenen Methode vorbereitet, narkotisiert (7.6.1) und der jeweiligen Verbrennungs- oder Schein-Intervention (7.6.2 oder 7.6.3) unterzogen. 60 min nach Trauma oder Scheinintervention wurde, nach Euthanasie (siehe 7.6.4). Das Blut wurde daraufhin einer rotationsthemboelastometrischen Untersuchung mit ROTEM[®] delta unterzogen (siehe 7.8.2).

7.10 Statistische Analyse

Eine a-priori durchgeführte Poweranalyse ergab bei einer biologisch relevanten Differenz von 20%, α von 0,05 und β von 0,2 eine Gruppenstärke von jeweils sechs Tieren.

Die Größe der Studienpopulation begrenzte, unter dem Aspekt einer erhöhten Prädisposition für das Auftreten von Fehlern 1. Art (falsch positiv) durch wiederholtes Testen einer übermäßigen Anzahl von Vergleichen an einem einzelnen Datensatz, statistisch die Anzahl der zu bewertenden Vergleiche. Deshalb wurden in dieser Dissertationsarbeit nur die folgenden für Aussage der Arbeit zentralen Vergleiche zur Untersuchung der Primär- und Sekundärhypothesen identifiziert. Hierzu zählten der Vergleich der CD4⁺ Treg-Aktivierung und hämostatischen Parameter zwischen Verbrennungsgruppe und Scheininterventionsgruppe der in 7.2 aufgelisteten

Versuchstiere. Des Weiteren wurden die Scheininterventionsgruppe der Wildtypiere jeweils mit den Scheininterventionsgruppen der Knockout-Tiere verglichen. Zusätzlich wurde die Verbrennungsgruppe der WT-Tiere jeweils mit den Verbrennungsgruppe der Knockout-Tiere.

Die Verteilung kontinuierlicher Variablen wurde mittels grafischer Darstellung und Testung nach Shapiro bewertet. Die Datensätze konnten nicht sicher als normalverteilt angenommen werden, sodass statistische Tests für nicht-normal verteilte Daten eingesetzt. Kontinuierliche Variablen wurden demnach als Median \pm Standardabweichung angegeben. Für die Intergruppenvergleiche wurden Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem P-Wert $< 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Da es sich in dieser Arbeit um eine exploratorische experimentelle Studie zu den Mechanismen komplexer immunologischer Interaktionen und nicht um eine konfirmatorische Studie mit Implikationen für die klinischen Praxis handelt, wurde – wie in der Literatur beschrieben - nicht auf multiple Vergleiche adjustiert (Althouse 2016, Chen, Feng et al. 2017). Für die statistische Analyse wurde Graphpad Prism Software, v6.05, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) verwendet. Die in den Grafiken dargestellten Box plots zeigen den Median \pm 1. Quartil und 3. Quartil, die Whiskers repräsentieren die Minimal- und Maximalwerte jedes Datensets.

7.11 Abbildungen

Abbildungen in dieser Dissertation wurden mithilfe von Microsoft® PowerPoint v16.35 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und Graphpad Prism in der Version 6.05 von GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA) erstellt.

8 Ergebnisse

Vorläufige Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit wurden 2017 auf der 40. Tagung der Shock Society (Fort Lauderdale, Miami, USA) (Rupp, Bergmann et al. 2017), 2018 auf dem deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (Berlin) und 2018 auf den Chirurgische Forschungstagen (Erlangen) präsentiert. Teile der endgültigen Ergebnisse zur Aktivierung der CD4⁺ - Tregs im Lymphknotengewebe sowie der Veränderung der hämostatischen Parameter bei CD40L-Gendefizienz und P-Selectin-Gendefizienz wurden 2021 in der Zeitschrift *Central European Journal of Immunology* publiziert (Rupp, Bergmann et al. 2021).

8.1 Validation des Gen-Knockout Modells

Die Forschungsfrage, welche Rolle der direkte Zellkontakt via CD40L und P-Selektin in der Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten spielt, wurden wie in 7. beschrieben in dieser Dissertationsarbeit in einem murinen Genknockout Modell untersucht.

In einem ersten Schritt wurde das murine Gen-Knockout-Modell für die geplante Testung der Hypothesen wie in 7.9.1 beschrieben validiert.

8.1.1 Die Zellpopulationen bei CD40-Ligand-Knockout

8.1.1.1 Die Gesamtzellpopulation in CD40L-gendefizienten Tieren.

Bei CD40L-Defizienz wurde in den Lymphknoten eine signifikant reduzierte Gesamtzellzahl in den Lymphknoten im Vergleich zu Wildtypkontrollen gemessen; die Zellzahl zeigte sich um 71% niedriger (siehe Abbildung 12, a). In der Milz wurde bei CD40L-Defizienz eine fast identische, nicht signifikant differente Gesamtzellzahl (Unterschied: 2%) im Vergleich zur Wildtypkontrolle gemessen (siehe Abbildung 12, b).

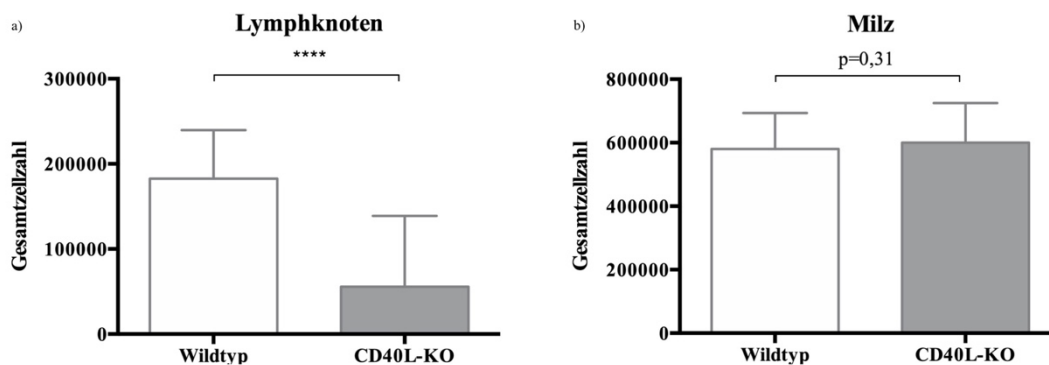


Abbildung 12 Gesamtzellpopulation in Wildtyp-Tieren und CD40L-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der gesamten Zellpopulation bestimmt. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl in den Lymphknoten ist signifikant erniedrigt in CD40L^{KO}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (a), in der Milz wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (b).

Dargestellt sind die jeweiligen Werte als Median mit Interquartilsabstand. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; $n_{(a)} = 38$, $n_{(b)} = 43$.

8.1.1.2 Die CD4⁺ Treg Zellpopulation in CD40L-gendefizienten Tieren.

Die absolute CD4⁺ Treg Zahl in Lymphknotengewebe CD40L-defizienter Versuchstieren ist, verglichen mit Wildtyptieren, auf 30% signifikant reduziert (siehe Abbildung 13, a). In der Milz wurde mit lediglich 55% ebenfalls eine signifikant erniedrigte absolute CD4⁺ Treg Zahl in CD40L-Defizienz im Vergleich zur Wildtypkontrolle gemessen (siehe Abbildung 13, b). Der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation bezogen auf die Gesamtzellpopulation bei CD40L-Defizienz unterscheidet sich im Lymphknotengewebe nicht signifikant zur Wildtypkontrollgruppe mit einem Unterschied von 0,5% ($p=0,16$) (siehe Abbildung 14, a). Im Milzgewebe weicht der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation bei CD40L-Defizienz mit einem Unterschied von 3,6% signifikant von der Wildtypkontrollgruppe ab ($p<0,0001$) (siehe Abbildung 14, b).

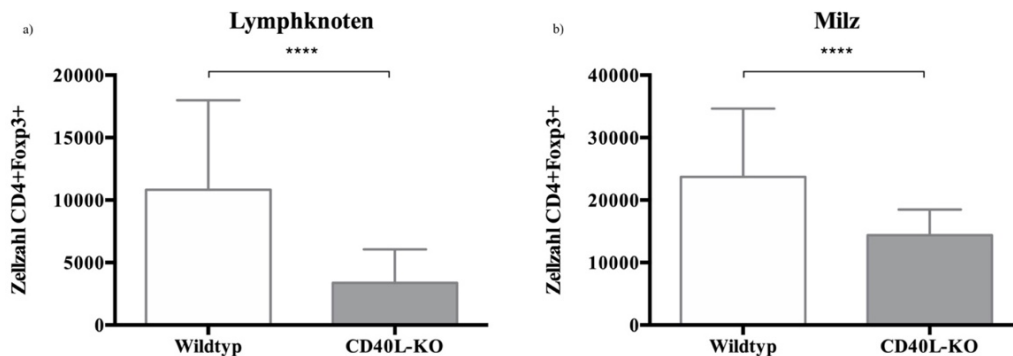


Abbildung 13 CD4⁺ Treg Zellpopulation in Wildtyptieren und CD40L-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der CD4⁺ Treg Zellpopulation bestimmt. In den Lymphknoten (a) und Milz (b) wurde in den CD40L^{KO}-Tieren eine durchschnittlich signifikant niedrigere Zellzahl der CD4⁺ Tregs verglichen mit Wildtyptieren gemessen.

Dargestellt sind die jeweiligen Werte mit Interquartilsabstand. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$; $n_{(a)}=38$, $n_{(b)}=43$.

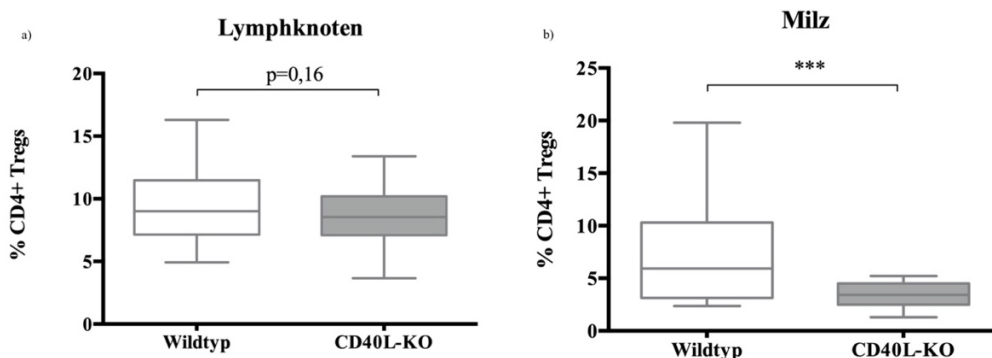


Abbildung 14 Anteil der CD4⁺ Tregs an der Gesamtzellpopulation bei Wildtyptieren und CD40L-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der gesamten Zellpopulation sowie der CD4⁺ Treg Zellpopulation bestimmt und der durchschnittliche Anteil der CD4⁺ Treg-Population an der Gesamtzellpopulation berechnet. Dargestellt ist der CD4⁺ Treg-Anteil an der Gesamtzellpopulation, kumuliert über die gemessenen Signalmoleküle pZAP, ZAP, pPKC und PKC. Während in Lymphknotengewebe keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden (a), unterscheidet sich der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation Milzgewebe bei CD40L-Defizienz signifikant von der Wildtypkontrollgruppe (b). Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n_{(a)}=38$, $n_{(b)}=43$.

8.1.2 Die Zellpopulationen bei P-Selektin-Knockout

8.1.2.1 Die Gesamtzellpopulation in P-Selektin-gendefizienten Tieren

Bei P-Selektin Defizienz wurde in den Lymphknoten eine um 1,59-fach signifikant erhöhte Gesamtzellzahl in den Lymphknoten im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen gemessen (siehe Abbildung 15, a). In der Milz wurden ebenfalls eine um 1,66-fach signifikant erhöhte Gesamtzellzahl bei P-Selektin Defizienz im Vergleich zur Wildtypkontrolle gemessen (siehe Abbildung 15, b).

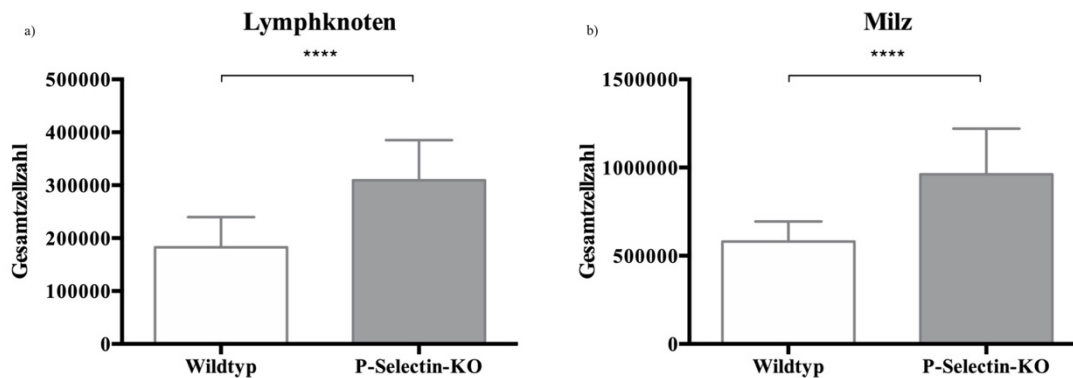


Abbildung 15 Unterschiede in der Gesamtzellpopulation und der CD4⁺ Treg Zellpopulation zwischen Wildtyp-Tieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die durchschnittlichen Zellzahlen der gesamten Zellpopulation bestimmt. Die Gesamtzellzahl in den Lymphknoten ist signifikant erhöht in P-Selektin^{KO}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (a), in der Milz wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (b).

Dargestellt sind die jeweiligen Werte als Median mit Interquartilsabstand. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; $n_{(a)} = 42$, $n_{(b)} = 45$.

8.1.2.2 Die CD4⁺ Treg Zellpopulation in P-Selektin-gendefizienten Tieren

Die absolute CD4⁺ Treg Zahl in Lymphknotengewebe P-Selektin-defizienter Versuchstieren ist, verglichen mit Wildtyp-Tieren, um 1,68-fach signifikant erhöht (siehe Abbildung 16, a). In der Milz wurden mit einer 1,39-fachen Erhöhung ebenfalls eine signifikant höhere absolute CD4⁺ Treg Zahl in P-Selektin Defizienz im Vergleich zur Wildtypkontrolle gemessen (siehe Abbildung 16, b). Der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation bei P-Selektin Defizienz ist im Lymphknotengewebe signifikant erniedrigt im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe mit einem Unterschied von 2,4% ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 17, a). Im Milzgewebe unterscheidet sich der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation bei P-Selektin Defizienz mit einem Unterschied von 2,9% signifikant von der Wildtypkontrollgruppe ($p = 0,005$) (siehe Abbildung 17, b).

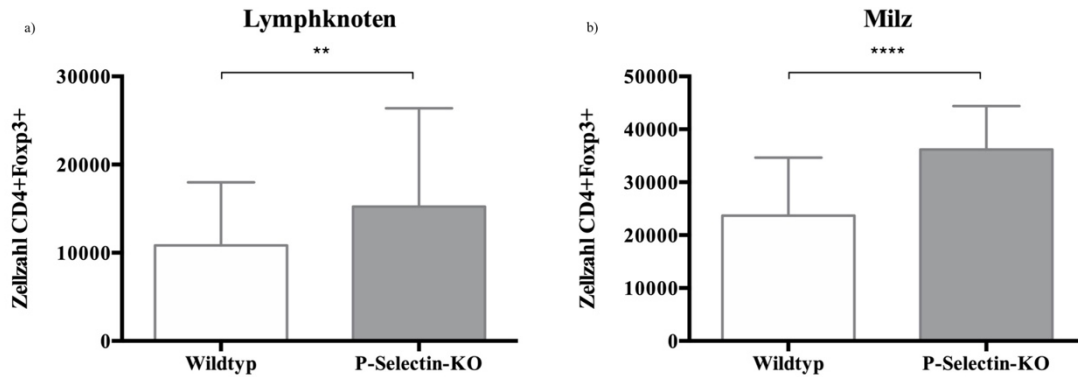


Abbildung 16 Unterschiede in der Gesamtzellpopulation und der CD4⁺ Treg Zellpopulation zwischen Wildtypieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der CD4⁺ Treg Zellpopulation bestimmt. In den Lymphknoten (a) und Milz (b) wurde in den P-Selektin^{KO}-Tieren eine signifikant größere Zellzahl der CD4⁺ Tregs verglichen mit Wildtypieren gemessen.

Dargestellt sind die jeweiligen Werte als Median mit Interquartilsabstand. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; $n_{(a)} = 42$, $n_{(b)} = 45$.

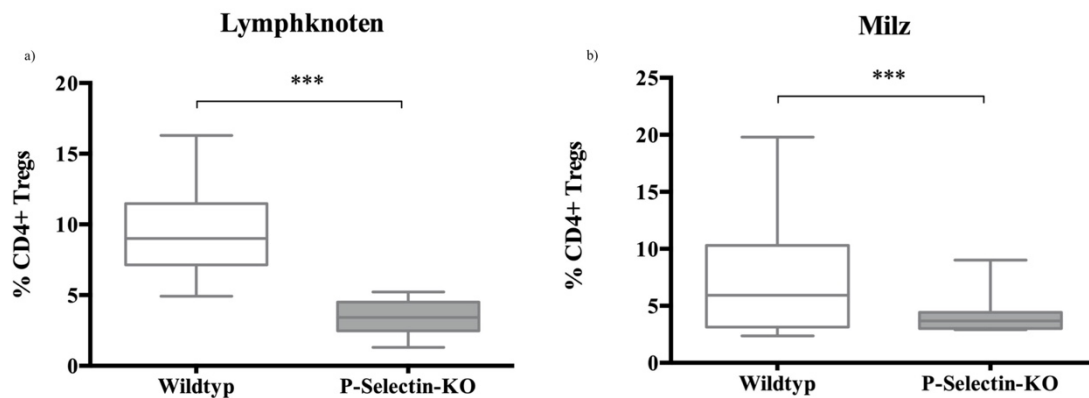


Abbildung 17 Anteil der CD4⁺ Tregs an der Gesamtzellpopulation bei Wildtypieren und P-Selektin-gendefizienten Tieren

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellzahlen der gesamten Zellpopulation sowie der CD4⁺ Treg Zellpopulation bestimmt und der Anteil der CD4⁺ Treg-Population an der Gesamtzellpopulation berechnet. Dargestellt ist der CD4⁺ Treg-Anteil an der Gesamtzellpopulation, kumuliert über die gemessenen Signalmoleküle pZAP, ZAP, pPKC und PKC. In Lymphknoten-(a) und Milzgewebe (b) unterscheidet sich der Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation bei P-Selektin Defizienz signifikant von der Wildtypkontrollgruppe.

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n_{(a)} = 42$, $n_{(b)} = 45$.

8.2 Posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

In dieser Arbeit wurde - wie in 7.7 beschrieben - die Aktivität und Aktivierung der CD4⁺ Tregs durch Phospho-Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurde die frühe posttraumatische Expression und Phosphorylierung von Signalmolekülen der CD4⁺ Treg-Aktivierung, (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ , wie in Studien zuvor etabliert untersucht (Hanschen, Tajima et al. 2011, Hanschen, Tajima et al. 2012, Bergmann, Hefele et al. 2016).

Die Abbildung 18 zeigt ein Histogramm, welches das Fluoreszenzsignal der CD4⁺ Tregs in Lymphknoten von scheinbehandelten Tieren und durch Verbrennungsintervention behandelten Tieren exemplarisch für das Signalmolekül PKC zeigt. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

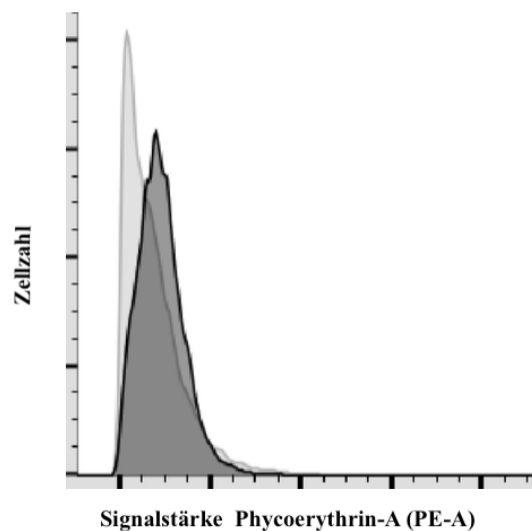


Abbildung 18 Die Phospho-Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse der posttraumatischen CD4⁺ - Treg-Aktivierung

Repräsentatives Histogramm das die Zellzahl gegen die Signalstärke des Phycoerythrin-A(PE-A)-Farbstoffs darstellt. Die posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ - Tregs, gemessen an der Expression von PKC- θ in CD4⁺ Tregs aus Lymphknotengewebe verbrennungstraumatisierter Tiere (dunkelgraue Umrandung und Füllung) ist größer als die scheinbehandelter Tiere (hellgraue Umrandung und Füllung). Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4⁺ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Imm*

In dieser Dissertationsarbeit konnte eine posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs in Lymphknoten, statistisch signifikant für pZAP, PKC und pPKC gezeigt werden (siehe Abbildung 19) (Rupp, Bergmann et al. 2021). Zusätzlich konnte dieser Effekt erstmals auch statistisch signifikant für die Signalmoleküle pZAP und PKC im Milzgewebe (siehe Abbildung 20) von Wildtyptieren gezeigt werden.

Zusammengenommen wird aus den präsentierten Daten deutlich, dass die CD4⁺ Tregs nach Trauma stärker aktiviert werden, als nach Scheinintervention.

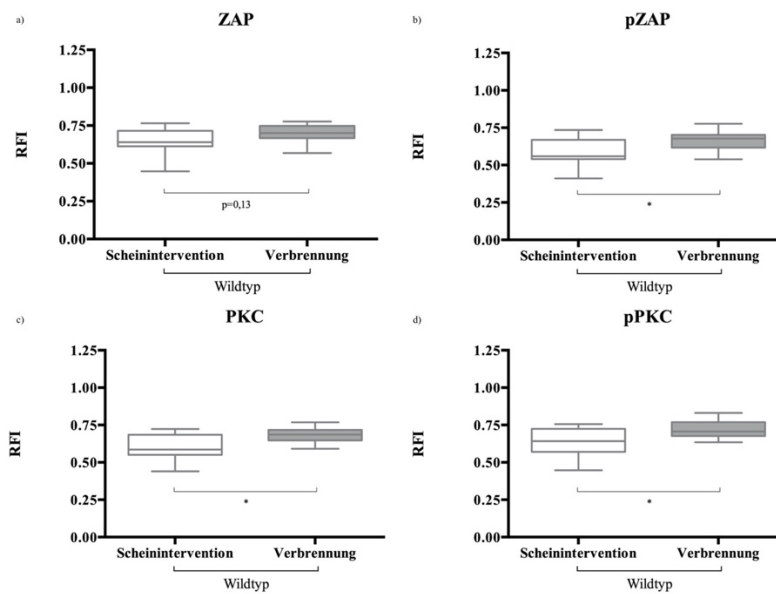


Abbildung 19 RFI in drainierenden Lymphknoten bei Wildtyptieren nach Schein- und Verbrennungstrauma

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) wurde in den Lymphknoten von schein- und verbrennungsbehandelten C57BL/6N-Mäusen gemessen. Dargestellt: a) ZAP; b) pZAP; c) PKC, d) pPKC.

Die RFI der Signalmolekülen pZAP, PKC und pPKC ist nach Verbrennung signifikant höher als nach Scheintrauma (b-d).

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=26$.

Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4⁺ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Imm*

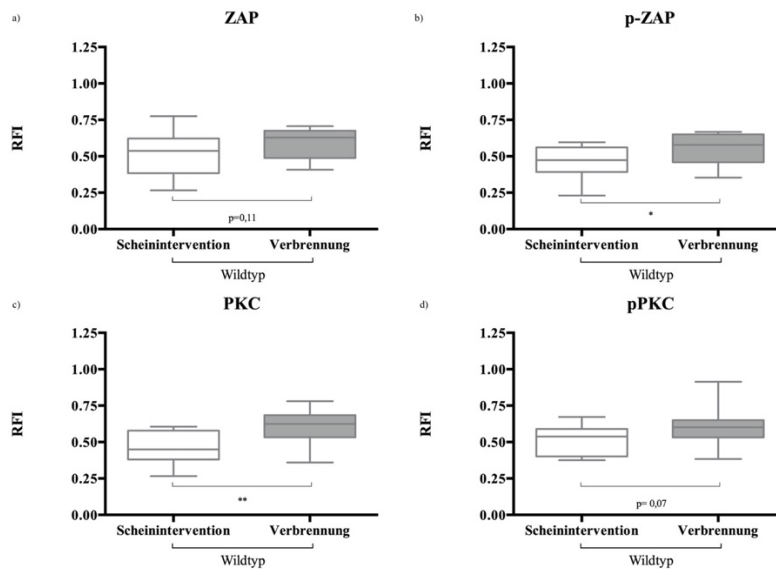


Abbildung 20 RFI im Milzgewebe bei Wildtyp-Tieren nach Schein- und Verbrennungstrauma

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) wurde in Milzgewebe von schein- und verbrennungsbehandelten C57BL/6N-Mäusen gemessen. Dargestellt: a) ZAP; b) pZAP; c) PKC, d) pPKC.

Die RFI der Signalmolekülen pZAP und PKC ist nach Verbrennung signifikant höher als nach Scheintrauma (b-c).

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=26$.

8.3 Der Einfluss von CD40-Ligand auf die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten

8.3.1 Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L Gendefizienz

Um die Primärhypothese - CD4⁺ Tregs und Thrombozyten interagieren in einem traumatischen Kontext über direkten Zellkontakt - zu testen, wurden die Unterschiede in dem CD4⁺ Treg Aktivierungsprozess zwischen CD40L-Knockout-Tieren und Wildtypkontrolltieren anhand der in 7.7 beschriebenen Fluoreszenzintensitätsmessung untersucht. Die Baseline-Aktivität, die posttraumatische Aktivierung und die posttraumatische Aktivität nach einer Stunde wurden als funktionelle Parameter untersucht.

8.3.1.1 Aktivierungsverhalten der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L Gendefizienz in Lymphknoten

In einem ersten Schritt wurden die Ergebnisse der phospho-durchflusszytometrischen Messungen von CD4⁺ Tregs in den drainierenden Lymphknoten verglichen (siehe

Abbildung 21). In CD40L-defizienten Tieren zeigten die Messungen der Baseline Aktivität CD4⁺ Tregs konstant niedrigere CD4⁺ Treg-Aktivierungslevel als in Wildtypkontrolltieren für alle getesteten Signalmoleküle. Dieses Ergebnis erreichte statistische Signifikanz für die Signalmoleküle ZAP und pZAP. Des Weiteren wurde ein signifikant niedrigeres Level der posttraumatischen Aktivität gemessen, wenn CD40L-abhängige Signalwege unterbrochen wurden. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Während das Verbrennungstrauma zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Wildtyptieren führte, wurde nach Trauma bei CD40L-Defizienz keine signifikante posttraumatische Aktivierung von CD4⁺ Tregs beobachtet (siehe Abbildung 21) (Rupp, Bergmann et al. 2021). Auch in der quantitativen Analyse (prozentualer Unterschied von Baselineaktivität und posttraumatischer Aktivität (zur Berechnung siehe 7.7.2.5, Formel 3) ist die posttraumatische Aktivierung bei CD40L-Defizienz geringer ausgeprägt als bei Wildtyptieren (siehe Tabelle 12).

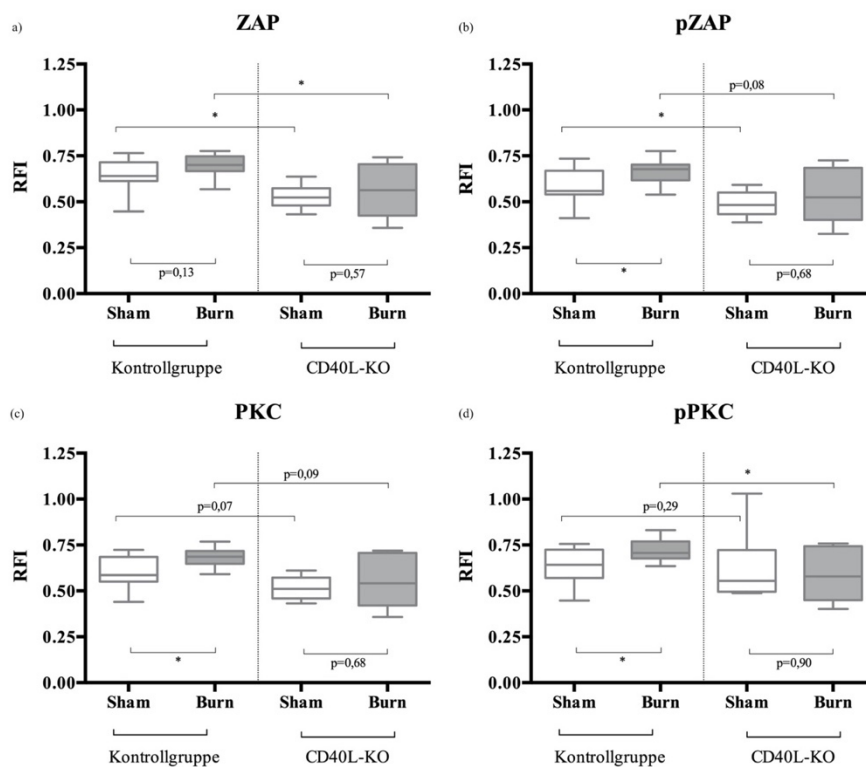


Abbildung 21 RFI-Messung bei CD40L-Gen-Knockout im Lymphgewebe

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) wurde in Lymphknotengewebe von schein- und verbrennungsbehandelten Wildtyptieren sowie CD40L-Knockout-Tieren gemessen. Dargestellt: a) ZAP; b) pZAP; c) PKC, d) pPKC Trauma führt zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyptieren - signifikant für pZAP, PKC, pPKC). Im Gegensatz dazu ist die posttraumatische Aktivierung bei CD40L-Knockout-Tieren verringert. Die Baseline-Aktivität und das Level der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs ist bei CD40L-Knockout-Tieren signifikant niedriger als bei Wildtyptieren.

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=38$.

*Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4⁺ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Imm**

Tabelle 12 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyptieren und CD40L-defizienten Tieren (Lymphgewebe)

Signalmolekül	Wildtyptiere	CD40L-Tiere
ZAP-70	7%	6%
pZAP-70	13%	9%
PKC- θ	13%	7%
pPKC- θ	13%	-6%

Dargestellt ist die prozentuale posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, berechnet aus der durchschnittlichen RFI nach Verbrennungstrauma und der durchschnittlichen RFI nach Scheintrauma: posttraumatische Aktivierung = ($\overline{RFI}_{\text{Verbrennungstrauma}} / \overline{RFI}_{\text{Scheintrauma}}$)-1. Die posttraumatische Aktivierung ist bei CD40L-Defizienz in allen getesteten Signalmoleküle niedriger als bei Wildtyptieren; n=38.

8.3.1.2 Aktivierungsverhalten bei CD40L Gendefizienz im Milzgewebe

In einem weiteren Schritt wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs im Milzgewebe zwischen Wildtyptieren und P-Selektin-defizienten Tieren verglichen siehe Abbildung 22. Die Baseline-Aktivität der CD4⁺ Tregs war durchgehend signifikant höher in CD40L-defizienten Tieren als bei Wildtypkontrolltieren für alle getesteten Signalmoleküle. Auch posttraumatische Aktivität erreichte ein signifikant höheres Level, wenn CD40L-abhängige Signalwege unterbrochen wurden.

Während das Trauma jedoch auch zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Wildtyptieren führte, führte Trauma bei CD40L-Defizienz zu keiner signifikant höheren posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs, in einem Fall war sie sogar signifikant niedriger. Auch die quantitative Analyse (zur Berechnung siehe 7.7.2.5, Formel 3) bestätigte das Ergebnis einer verminderten posttraumatische Aktivierung bei CD40L-Defizienz im Gegensatz zu Wildtyptieren (siehe Tabelle 13).

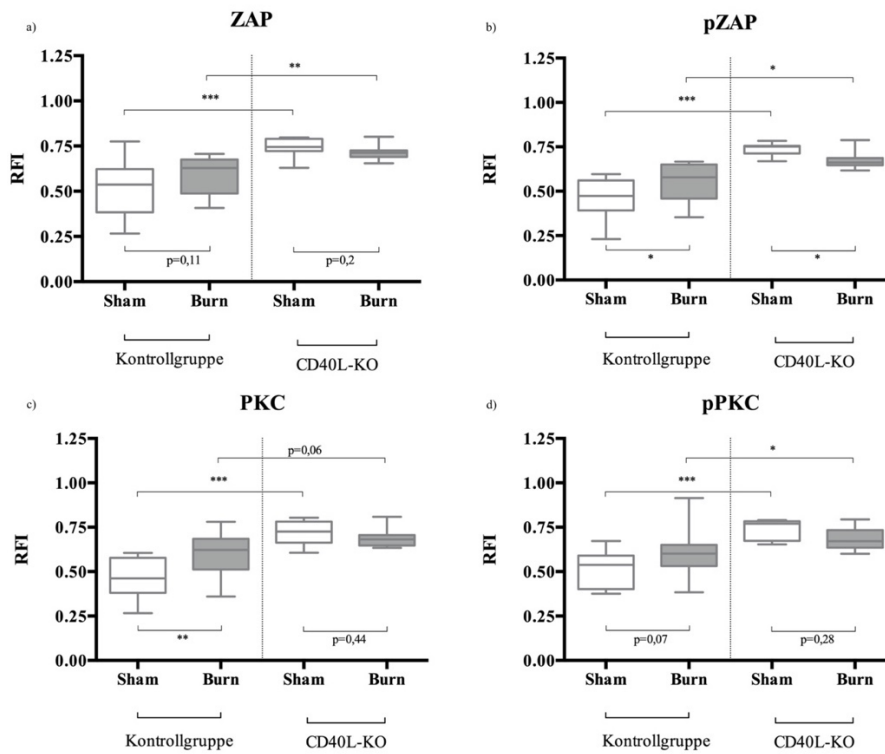


Abbildung 22 RFI-Messung bei CD40L-Gen-Knockout im Milzgewebe

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) wurde in Milzgewebe von schein- und verbrennungsbehandelten Wildtyp-Tieren sowie CD40L-Knockout-Tieren gemessen. Dargestellt: a) ZAP; b) pZAP; c) PKC, d) pPKC Trauma führt zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyp-Tieren (signifikant für pZAP, PKC, pPKC). Im Gegensatz dazu ist die posttraumatische Aktivierung bei CD40L-Knockout-Tieren verringert. Die Baseline-Aktivität und das Level der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs ist bei CD40L-Knockout-Tieren signifikant niedriger als bei Wildtyp-Tieren.

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=43$.

Tabelle 13 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyp-Tieren und CD40L-defizienten Tieren (Milzgewebe)

Signalmolekül	Wildtyp-Tiere	CD40L-Tiere
ZAP-70	7%	-8%
pZAP-70	18%	-1%
PKC- θ	23%	-6%
pPKC- θ	14%	0%

Dargestellt ist die prozentuale posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, berechnet aus der durchschnittlichen RFI nach Verbrennungstrauma und der durchschnittlichen RFI nach Scheintrauma: posttraumatische Aktivierung = $(\overline{RFI}_{Verbrennungstrauma} / \overline{RFI}_{Scheintrauma}) - 1$. Die posttraumatische Aktivierung ist bei CD40L-Defizienz in allen getesteten Signalmoleküle niedriger als bei Wildtyp-Tieren; $n=43$.

8.3.1.3 Verteilung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L-Defizienz

Die jeweilige Anzahl der CD4⁺ Tregs in den unterschiedlichen Geweben lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Ausgangswerte bei Gendefizienz (siehe 8.1.1) nicht direkt quantitativ vergleichen.

Das prozentuale Verteilungsverhältnis der CD4⁺ Treg-Subpopulation zwischen drainierenden LK und Milz bei CD40L-Defizienz ist jedoch verändert.

Bei Wildtyptieren befinden sich im nicht-traumatisierten Zustand mehr CD4⁺ Tregs in der Milz (CD4⁺ Tregs in der Milz: 62% ; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 38%).

Diese Balance ändert sich bei Trauma, so fallen die CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK prozentual um 9% ab (CD4⁺ Tregs in der Milz: 71% ; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 29%). In CD40L-Defizienz ist die Verteilung der CD4⁺ Tregs im nicht-traumatisierten Zustand im Vergleich zu Wildtyptieren deutlicher in Richtung Milz gerichtet (CD4⁺ Tregs in der Milz: 75% ; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 25%). Diese Balance bleibt nach Trauma - im Gegensatz zu Wildtyptieren - bei CD40L-Defizienz relativ erhalten (CD4⁺ Tregs in der Milz: 73% ; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 27%). Eine genaue Darstellung des Verhältnis der CD4⁺ Treg Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz bei CD40L^{KO} ist dargestellt in Tabelle 14.

Tabelle 14 Verhältnis der CD4⁺ Treg Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz bei CD40L^{KO}

Gewebetyp	Wildtyp		CD40L ^{KO}	
	Schein-intervention	Trauma	Schein-intervention	Trauma
Anteil der lymphknotenbasierten CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtpopulation der CD4 ⁺ Tregs	38%	29%	25%	27%
Anteil der milzbasierten CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtpopulation der CD4 ⁺ Tregs	62%	71%	75%	73%
Gesamtpopulation	100%	100%	100%	100%

Dargestellt ist das Verhältnis der CD4⁺ Treg-Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz. Der Prozentsatz berechnet sich aus der CD4⁺ Tregzellzahl im jeweiligen Gewebe bezogen auf die CD4⁺ Treg Gesamtpopulation (Zellzahl CD4⁺ TregsGewebe / Zellzahl CD4⁺ TregsGesamt).

Bei Wildtyptieren befinden sich im nicht-traumatisierten Zustand prozentual mehr CD4⁺ Tregs in der Milz. Diese Balance ändert sich bei Trauma, so fallen die CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK ab.

Bei CD40L-Defizienz ist die Verteilung der CD4⁺ Tregs im nicht-traumatisierten Zustand im Vergleich zu Wildtyptieren deutlicher in Richtung Milz gerichtet. Diese Balance bleibt nach Trauma - im Gegensatz zu Wildtyptieren - bei CD40L-Defizienz erhalten; n=43.

8.3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend bestätigte sich die Primärhypothese zur CD4⁺ Treg-Aktivierungsverhalten bei CD40L-Gen-Defizienz. Bei CD40L-Knockout wurde eine signifikant niedrigere posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, sowohl in Lymphknotengewebe als auch Milzgewebe beobachtet. Zusätzlich wurden signifikante Unterschiede in funktionellen Parametern wie der CD4⁺ Tregs Baseline-Aktivität und der absoluten Höhe der posttraumatischen Aktivität gemessen; im Vergleich zum Wildtyp wurde tendenziell eine niedrigere lymphatische sowie höhere splenische CD4⁺ Treg-Aktivität beobachtet. Zudem wurde eine veränderte zentrale und periphere lymphatische Verteilung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools gemessen gemessen, bei CD40L-Defizienz kommt es zu einer Zentralisierung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools in Richtung Milz, eine Verteilung, welche sich posttraumatisch im Vergleich zu Wildtyptieren nicht ändert.

8.3.2 Veränderung der hämostatischen Funktion der Thrombozyten bei CD40L Gendefizienz

Wie in 7.8 ausgeführt wurde Rotationsthromboelastometrie (ROTEM[®] Delta) eingesetzt, um die Auswirkungen eines Traumas auf die Thrombozytenaktivierung und -funktion bei CD40L-Defizienz zu untersuchen.

Das Zeitintervall bis zum Beginn der Hämostase - die Gerinnungszeit (CT) - ist bei nicht-traumatisierten CD40L^{KO}-Tieren (Scheinintervention) im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verlängert. Nach Trauma ist die Gerinnungszeit (CT) im Vergleich zum nicht-traumatisierten Zustand weder bei Wildtyptieren noch bei CD40L^{KO}-Tieren signifikant verändert. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ist bei nicht-traumatisierten Tieren mit CD40L-Defizienz im Vergleich zu WT-Tieren nicht statistisch signifikant verändert. Nach Trauma verändert sich die MCF im Vergleich zum Niveau nach Scheinintervention bei WT-Tieren nicht statistisch signifikant. Diese Beobachtung gilt auch für CD40L-Gendefizienz. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Die Geschwindigkeit der Gerinnselformung (CFT & α -Winkel) ist bei CD40L-Gendefizienz im Vergleich zu WT-Tieren signifikant verringert. Nach Trauma ist die Geschwindigkeit der Gerinnselformung tendenziell (nicht-signifikant) verringert. Im Gegensatz dazu zeigen die Daten bei Tieren mit CD40L-Mangel einen Trend zu einer (nicht-signifikant) schnelleren Gerinnselformung posttraumatisch. Diese Ergebnisse sind grafisch dargestellt in Abbildung 23. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

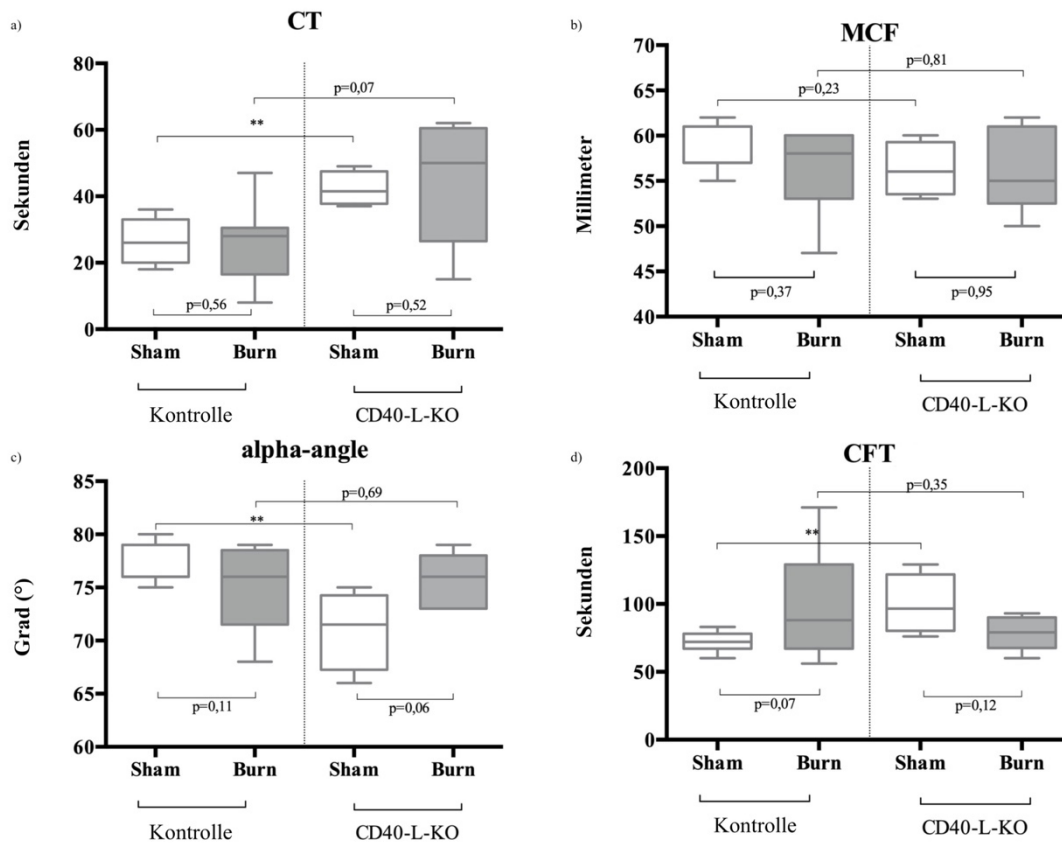


Abbildung 23 **Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter bei CD40L-Gen-Defizienz.**

Mittels Rotationsthromboelastometrie (ROTEM® Delta) wurden die Auswirkungen eines Traumas auf die Thrombozytenaktivierung und -funktion bei CD40L-Defizienz untersucht.

Die CT ist bei nicht-traumatisierten CD40L^{KO}-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant verlängert. Nach Trauma ist die CT im Vergleich zum nicht-traumatisierten Zustand weder bei Wildtyp-Tieren noch bei CD40L^{KO}-Tieren signifikant verändert.

Die MCF ist bei nicht-traumatisierten Tieren mit CD40L-Defizienz im Vergleich zu WT-Tieren nicht statistisch signifikant verändert. Nach Trauma verändert sich die MCF im Vergleich zum Niveau nach Scheinintervention bei WT-Tieren nicht statistisch signifikant. Diese Beobachtung gilt auch für CD40L-Gen-Defizienz.

CFT und α -Winkel sind bei CD40L-Gen-Defizienz im Vergleich zu WT-Tieren im nichttraumatisierten Zustand signifikant verringert. Nach Trauma ist die Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung tendenziell verringert. Im Gegensatz dazu zeigen die Daten bei Tieren mit CD40L-Mangel einen Trend zu einer schnelleren Gerinnungsbildung posttraumatisch.

Boxes: Median \pm Q1 and Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=29$.

Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4+ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Imm*

Zusammenfassend zeigten die rotationsthromboelastischen Ergebnisse bei CD40L-Defizienz, dass sich der Beginn der Gerinnung verzögert und die Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verringert ist. Posttraumatisch kam es bei CD40L Gen-Knockout zu keinem statistisch signifikant veränderten Gerinnungsverhalten verglichen mit der Kontrollgruppe

8.4 Der Einfluss von P-Selektin auf CD4⁺ regulatorischen T-Zellen und Thrombozyten

Die Primärhypothese - CD4⁺ Tregs und Thrombozyten interagieren in einem traumatischen Kontext über direkten Zellkontakt – wurde auch bei Gen-Defizienz von P-Selektin getestet. Analog zu 8.3 wurden die Unterschiede in der CD4⁺ Treg Aktivierungsprozess zwischen P-Selektin-Knockout Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren anhand der in 7.7 beschriebenen Fluoreszenzintensitätsmessung untersucht.

8.4.1 Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz

8.4.1.1 Aktivierungsverhalten bei P-Selektin Gendefizienz in Lymphknoten

Zuerst wurden die Ergebnisse der phospho-durchflusszytometrischen Messungen von CD4⁺ Tregs in den drainierenden Lymphknoten verglichen (siehe Abbildung 24). In P-Selektin-defizienten Tieren zeigte die Messungen der Baseline Aktivität von CD4⁺ Tregs konstant niedrigere CD4⁺ Treg-Aktivierungslevel Tieren als in Wildtypkontrolltieren für alle getesteten Signalmoleküle. Dieses Ergebnis ist lediglich ein Trend und erreicht keine statistische Signifikanz. Es wurde ein signifikant niedrigeres Level der posttraumatischen Aktivität bei P-Selektin Gen-Defizienz beobachtet. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Während das Verbrennungstrauma zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Wildtyptieren führte, wurde nach Trauma bei P-Selektin Defizienz keine signifikante posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs beobachtet (siehe Abbildung 24) (Rupp, Bergmann et al. 2021). Auch in der Quantifizierung der CD4⁺ Treg-Aktivierung (zur Berechnung siehe 7.7.2.5, Formel 3) zeigt sich eine posttraumatische Aktivierung bei P-Selektin Defizienz geringer ausgeprägt als bei Wildtyptieren (siehe Tabelle 15).

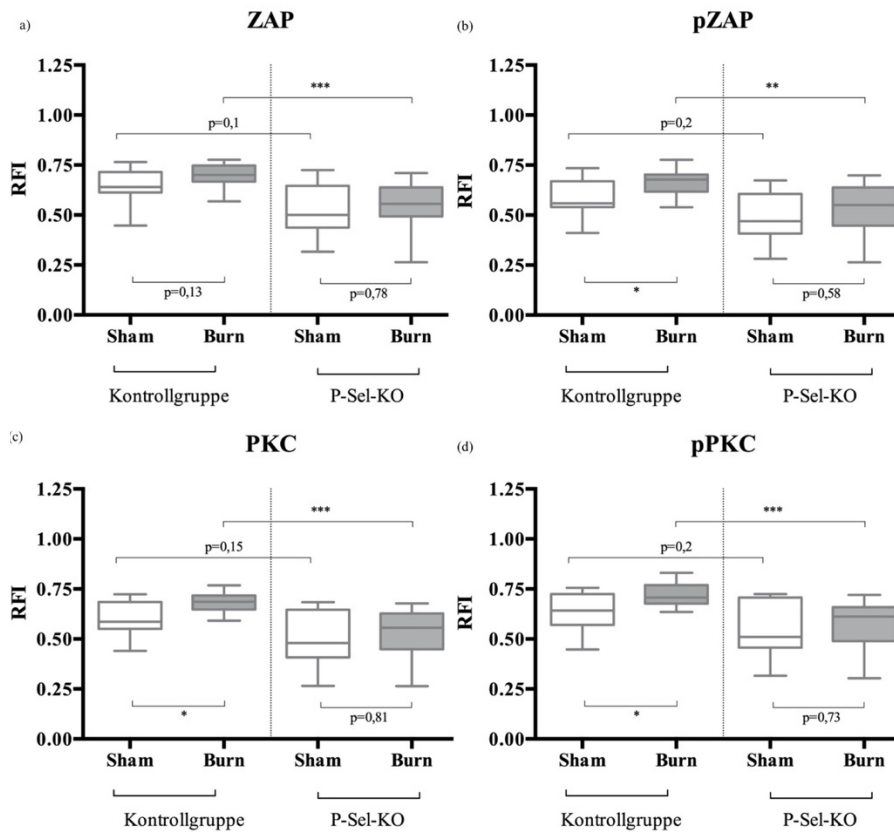


Abbildung 24 RFI-Messung bei P-Selektin-Gen-Knockout im Lymphgewebe

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) wurde in Lymphknotengewebe von schein- und verbrennungsbehandelten Wildtyp-Tieren sowie P-Selektin-Knockout-Tieren gemessen. Trauma führt zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyp-Tieren (signifikant für pZAP, PKC, pPKC). Im Gegensatz dazu ist die posttraumatische Aktivierung bei P-Selektin-Knockout-Tieren verringert. Die Baseline-Aktivität und das Level der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen P-Selektin-Knockout-Tieren und Wildtyp-Tieren.

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=42$.

Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann und M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4+ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Imm*

Tabelle 15 Posttraumatische Aktivierung bei Wildtyp-Tieren und P-Selektin-defizienten Tieren (Lymphgewebe)

Signalmolekül	Wildtyp-Tiere	P-Sel ^{KO} -Tiere
ZAP-70	7%	8%
pZAP-70	13%	6%
PKC- θ	13%	6%
pPKC- θ	13%	0%

Dargestellt ist die prozentuale posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, berechnet aus der durchschnittlichen RFI nach Verbrennungstrauma und der durchschnittlichen RFI nach Scheintrauma: posttraumatische Aktivierung = $(\overline{RFI}_{\text{Verbrennungstrauma}} / \overline{RFI}_{\text{Scheintrauma}}) - 1$. Die posttraumatische Aktivierung ist bei P-Selektin Defizienz in allen getesteten Signalmoleküle niedriger als bei Wildtyp-Tieren; $n=42$.

8.4.1.2 Aktivierungsverhalten bei P-Selektin Gendefizienz im Milzgewebe

Zur Testung der Primärhypothese für das Milzgewebe wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs im Milzgewebe zwischen Wildtyp-Tieren und P-Selektin-defizienten Tieren verglichen (Abbildung 25). Die von der Fluoreszenzintensität abgeleitete Baseline-Aktivität der CD4⁺ Tregs unterschied sich zwischen Wildtypkontrolltieren und P-Selektin-defizienten Tieren in keinem Signalmolekül. Für die posttraumatische Aktivität wurden tendenziell erniedrigte Level gemessen, wenn P-Selektin-abhängige Signalwege unterbrochen wurden - dies erreichte statistische Signifikanz für Proben inkubiert mit anti-PKC Antikörpern (Abbildung 25).

Es wurde beobachtet, dass die intrazelluläre Aktivierung von CD4⁺ Tregs in der Phospho-Durchflusszytometrie nach Unterbrechung des direkten Zell-Zellkontakts über das Adhäsionsmolekül P-Selektin herabgesetzt war. Auch die quantitative Analyse zeigte, dass die posttraumatische Aktivierung bei CD40L-Defizienz deutlich geringer ausgeprägt als bei Wildtyp-Tieren (siehe Tabelle 16).

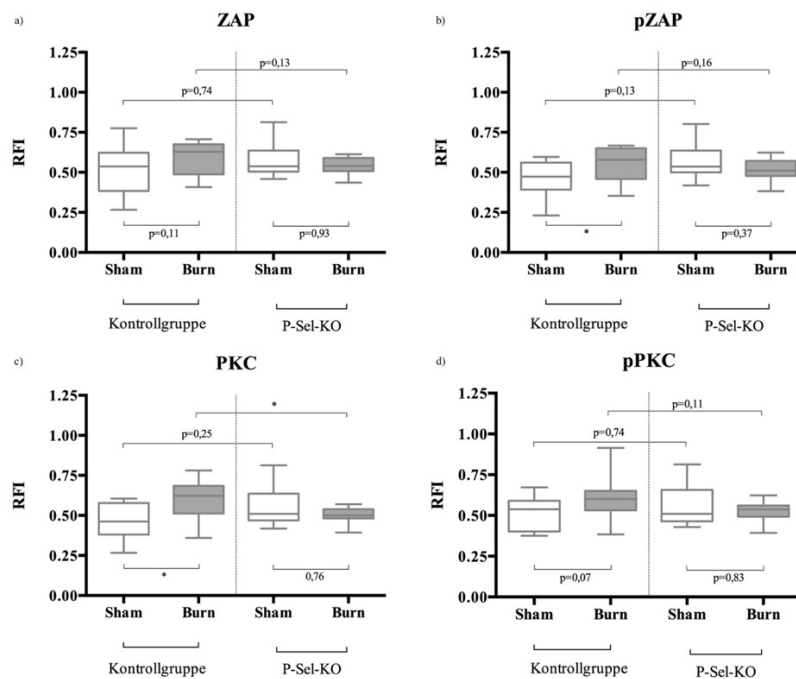


Abbildung 25 RFI-Messung bei P-Selektin-Gen-Knockout im Milzgewebe

Die Expression und Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ von CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen wurde in Milzgewebe von schein- und verbrennungsbehandelten Wildtyp-Tieren sowie P-Selektin-Knockout-Tieren gemessen. Dargestellt: a) ZAP; b) pZAP; c) PKC, d) pPKC

Trauma führt zu einer signifikanten posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyp-Tieren (signifikant für pZAP, PKC, pPKC). Im Gegensatz dazu ist die posttraumatische Aktivierung bei P-Selektin-Knockout-Tieren verringert. Die Baseline-Aktivität zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen P-Selektin-Knockout-Tieren und Wildtyp-Tieren. Das Level der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs ist bei P-Selektin-Knockout-Tieren niedriger als bei Wildtyp-Tieren (signifikant für PKC).

Boxes: Median \pm Q1 und Q3, Whiskers: minimaler und maximaler Wert jedes Datensatzes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n=45$.

Tabelle 16 *Posttraumatische Aktivierung bei WT-Tieren und P-Selektin-defizienten Tieren (Milzgewebe)*

Signalmolekül	Wildtyptiere	P-Sel ^{KO} -Tiere
ZAP-70	7%	-3%
pZAP-70	18%	-4%
PKC-θ	23%	-1%
pPKC-θ	14%	0%

Dargestellt ist die prozentuale posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, berechnet aus der durchschnittlichen RFI nach Verbrennungstrauma und der durchschnittlichen RFI nach Scheintrauma: $\text{posttraumatische Aktivierung} = (\overline{RFI}_{\text{Verbrennungstrauma}} / \overline{RFI}_{\text{Scheintrauma}}) - 1$. Die posttraumatische Aktivierung ist bei P-Selektin Defizienz in allen getesteten Signalmoleküle niedriger als bei Wildtyptieren; n=45.

8.4.1.3 Verteilung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Defizienz

Analog zur Analyse bei CD40L-Defizienz ist es nicht möglich, die jeweilige Zellzahl der CD4⁺ Tregs in den unterschiedlichen Geweben aufgrund der unterschiedlichen Ausgangswerte bei P-Selektin Gendefizienz (beschrieben in 8.1.2) direkt quantitativ zu vergleichen.

Die Analyse zeigte jedoch, dass das prozentuale Verteilungsverhältnis der CD4⁺ Treg-Subpopulation zwischen drainierenden LK und Milz bei P-Selektin Defizienz verändert ist. Bei Selektin Defizienz ist die Verteilung der CD4⁺ Tregs im nicht-traumatisierten Zustand im Vergleich zu Wildtyptieren deutlicher in Richtung des zentralen Kompartiments (Milz) gerichtet (CD4⁺ Tregs in der Milz: 69%; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 31%). Diese Balance ändert sich nach Trauma - im Gegensatz zu Wildtyptieren - bei CD40L-Defizienz nicht (CD4⁺ Tregs in der Milz: 68% ; CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK: 32%). Eine genaue Darstellung des Verhältnis der CD4⁺ Treg Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz bei P-Sel^{KO} ist dargestellt in Tabelle 17.

Tabelle 17 *Verhältnis der foxP3⁺ Zellzellzahlen zwischen Lymphknoten und Milz*

Gewebetyp	Wildtyp		P-Sel ^{KO}	
	Schein-intervention	Trauma	Schein-intervention	Trauma
Anteil der lymphknotenbasierten CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtpopulation der CD4 ⁺ Tregs	38%	29%	31%	32%
Anteil der milzbasierten CD4 ⁺ Tregs an der Gesamtpopulation der CD4 ⁺ Tregs	62%	71%	69%	68%
Gesamt:	100%	100%	100%	100%

Dargestellt ist das Verhältnis der CD4⁺ Treg-Zellzellzahlen in Lymphknoten und Milz. Der Prozentsatz

berechnet sich aus der CD4⁺ Tregzellzahl im jeweiligen Gewebe bezogen auf die CD4⁺ Treg Gesamtpopulation (Zellzahl CD4⁺ TregsGewebe / Zellzahl CD4⁺ TregsGesamt).

Bei Wildtyptieren befinden sich im nicht-traumatisierten Zustand mehr CD4⁺ Tregs in der Milz. Diese Balance ändert sich bei Trauma, so fallen die CD4⁺ Tregs in den drainierenden LK ab.

Bei P-Selektin Defizienz ist die Verteilung der CD4⁺ Tregs im nicht-traumatisierten Zustand im Vergleich zu Wildtyptieren deutlicher in Richtung Milz gerichtet. Diese Balance bleibt nach Trauma - im Gegensatz zu Wildtyptieren - bei P-Selektin Defizienz relativ erhalten. n=45.

8.4.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend bestätigte sich auch die Primärhypothese zur CD4⁺ Treg-Aktivierungsverhalten bei P-Selektin Gendefizienz. Bei P-Selektin-Knockout wurde eine signifikant niedrigere posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs, sowohl in Lymphknotengewebe als auch Milzgewebe beobachtet. Zusätzlich wurden signifikante Unterschiede in der absoluten Höhe der posttraumatischen Aktivität gemessen, im Vergleich zum Wildtyp wurde posttraumatisch eine niedrigere lymphatische CD4⁺ Treg-Aktivität beobachtet. Zudem zeigte sich eine veränderte lymphatische und splenische Verteilung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools; bei P-Selektin-Defizienz kommt es zu einer Zentralisierung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools in Richtung Milz, eine Verteilung, welche sich posttraumatisch im Vergleich zu Wildtyptieren nicht ändert.

8.4.2 Veränderung der hämostatische Funktion der Thrombozyten bei P-Selektin Gendefizienz

Analog zu den Untersuchungen bei CD40L-Defizienz wurden rotationsthromboelastometrische Messungen bei P-Selektin Gen-Knockout durchgeführt, wie in 7.8 beschrieben.

Bei P-Selektin-Knockout tendiert das Zeitintervall bis zum Beginn der Hämostase - die Gerinnungszeit (CT) - bei nicht-traumatisierten Tieren (= nach Scheinintervention) zu einer Verlängerung. Diese erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Nach Trauma ist die Gerinnungszeit (CT) im Vergleich zum nicht-traumatisierten Zustand weder bei Wildtyptieren noch P-Selektin^{KO} -Tieren signifikant verändert. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ist bei nicht-traumatisierten Tieren mit P-Selektin Defizienz im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verringert. Nach Trauma verändert sich die MCF im Vergleich zum Niveau nach Scheinintervention bei Wildtyptieren nicht statistisch signifikant. Diese Beobachtung gilt auch für P-Selektin Gendefizienz. (Rupp, Bergmann et al. 2021)

Bei P-Selektin Defizienz finden sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Gerinnselbildung (CFT & α -Winkel) im Vergleich zu WT-Tieren. Nach Trauma ist die Geschwindigkeit der Gerinnselbildung bei Wildtyp-Tieren tendenziell verringert. Ein P-Selektin-Mangel beeinflusst die Geschwindigkeit der posttraumatischen Gerinnselbildung nicht. (Rupp, Bergmann et al. 2021) Diese Ergebnisse sind grafisch dargestellt in Abbildung 26.

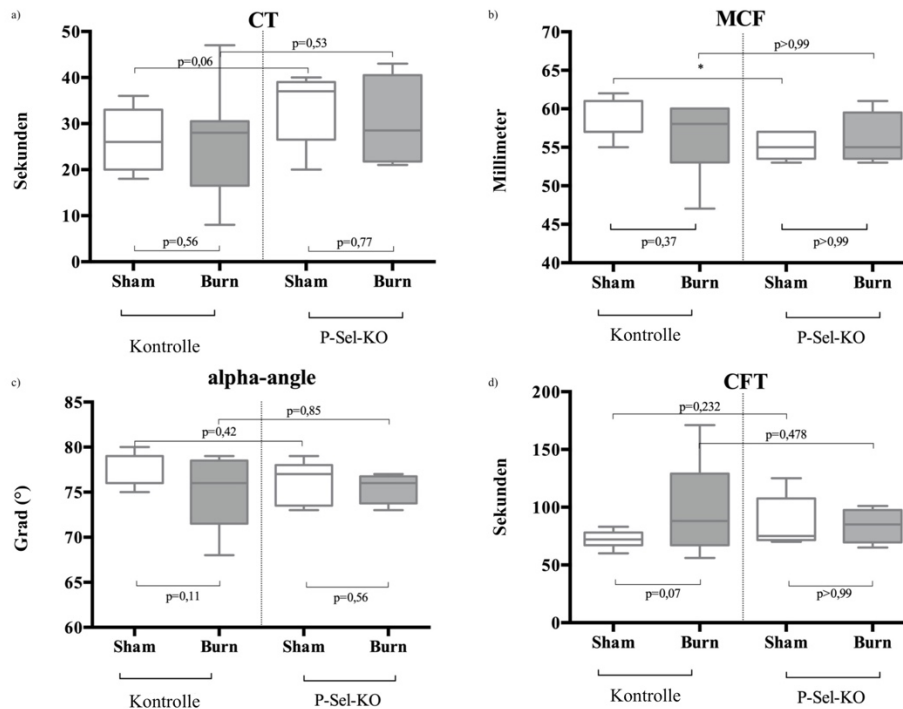


Abbildung 26 **Veränderungen der rotationsthemboelastometrischen Parameter bei P-Selektin Gendefizienz**

Mittels Rotationsthemboelastometrie (ROTEM® Delta) wurden die Auswirkungen eines Traumas auf die Thrombozytenaktivierung und -funktion bei CD40L-Defizienz untersucht.

a) Bei P-Selektin-Knockout tendiert die CT bei nicht-traumatisierten Tieren zu einer nicht-signifikanten Verlängerung. Nach Trauma ist die CT im Vergleich zum nicht-traumatisierten Zustand weder bei Wildtyp-Tieren noch P-Selektin^{KO}-Tieren signifikant verändert. b) Die MCF ist bei nicht-traumatisierten Tieren mit P-Selektin Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant verringert. Nach Trauma verändert sich die MCF im Vergleich zum Niveau nach Scheinintervention bei Wildtyp-Tieren nicht signifikant. Diese Beobachtung gilt auch für P-Selektin Gendefizienz. Bei P-Selektin Defizienz finden sich keine signifikanten Unterschiede in α -Winkel c) oder CFT d) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Nach Trauma ist die Geschwindigkeit der Gerinnselbildung bei Wildtyp-Tieren tendenziell verringert.

Ein P-Selektin-Mangel beeinflusst die Geschwindigkeit der posttraumatischen Gerinnselbildung nicht.

Boxes: Median \pm Q1 and Q3, whiskers: min. and max value of each data set, n = 7-15 per group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n=29.

Darstellung übernommen und modifiziert unter der Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) aus Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4+ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." Cent Eur J Imm

Zusammenfassend zeigten die rotationsthromboelastischen Ergebnisse bei P-Selektin Defizienz, dass sich der Beginn der Gerinnung verzögert und die thrombozytär beeinflusste Gerinnungsfestigkeit im Vergleich zu Wildtyptieren verringert ist. Posttraumatisch kam es bei P-Selektin Genknockout zu keinem veränderten Gerinnungsverhalten verglichen mit der Kontrollgruppe.

9 Diskussion

In dieser Dissertationsarbeit konnten drei entscheidende Hauptbefunde erhoben werden. Zum einen konnte im Rahmen der Validation des Studienmodells erstmals gezeigt werden, dass ein Verbrennungstrauma – im Gegensatz zu einer Scheinintervention – sowohl im Lymphgewebe als auch in der Milz eine signifikante Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyp-Mäusen nach einer Stunde induziert. Bei CD40L-Defizienz zeigte sich sowohl eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl als auch der CD4⁺Treg Population. Bei P-Selektin-Defizienz zeigte sich sowohl eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl als auch der CD4⁺Treg-Population. Bei jeweils erhaltenen CD4⁺ Treg Zellpopulationen konnte das Modell somit für die jeweiligen Gendefizienzen validiert werden.

Zum Zweiten konnte in dieser Dissertationsschrift erstmals gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der CD40L-Interaktionen in einer signifikant verringerten posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs im Vergleich zum Wildtyp resultiert. Zudem wurde im Vergleich zum Wildtyp phosphodurchflusszytometrisch eine niedrigere lymphatische sowie höhere splenische CD4⁺ Treg-Aktivität sowie eine ein – im immunologischen Gleichgewicht - splenisch orientierter Shift in der Verteilung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools beobachtet.

In einem weiteren Abschnitt dieser Studie wurde erstmals gezeigt, dass eine Disruption der P-Selektin-abhängigen Interaktionen posttraumatisch in einer signifikant verringerten Aktivierung der CD4⁺ Tregs im Vergleich zu Wildtyptieren resultiert. In den phosphodurchflusszytometrischen Untersuchungen wurde zudem, im Vergleich zum Wildtyp, posttraumatisch eine niedrigere lymphatische CD4⁺ Treg-Aktivität sowie eine - in Homöostase - relative Translokation des reagiblen CD4⁺ Treg Pools in das Milzgewebe gemessen.

Zum Dritten wurden bei Gendefizienzen von CD40L und P-Selectin jeweils hypokoagulatorische Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter beobachtet, die posttraumatische Hämostase bei Gendefizienz unterlag jedoch keinen signifikanten posttraumatischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp.

9.1 Diskussion der Methodik

9.1.1 Versuchstiere

In dieser Dissertationsarbeit wurden die Interaktion der CD4⁺ Tregs mit Thrombozyten über einen direkten Zellkontakt-Mechanismus nach Trauma im Tiermodell untersucht. Nach einem immunologischen Stimulus im Rahmen eines Verbrennungsmodells mit Wildtyp und Gen-Knockoutmäusen konnte die CD4⁺ Treg-Aktivität mittels Durchflusszytometrie und die thrombozytäre Aktivierung über eine ROTEM[®]-Messung analysiert und verglichen werden. Die Bewertung diese komplexen und interdependenten Prozesse nach Trauma ist aus verschiedenen Gründen dem Tiermodell vorbehalten. Zwar konnte eine Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten zuvor in einer in-vitro-Studie beobachtet werden (Zhu, Huang et al. 2014), aber sowohl die vielseitigen Effekte der freiwerdenden endogenen Moleküle bei traumainduziertem Zellschaden als auch die komplexe dynamische Reaktion des Organismus auf hämodynamischer und immunologischer Ebene nach einem traumatischen Stimulus können in in-vitro-Studien nicht zuverlässig abgebildet werden. So eignet sich das Mausmodell - bei einer 80% genetischen Übereinstimmung zum Menschen - gut für hypothesengenerierende Studien molekularer Mechanismen nach Trauma (Waterston, Lindblad-Toh et al. 2002). Zudem bieten hypothesengenerierende mechanistische Studien mit genetisch identischen Mäusen aus statistischer Sicht Vorteile; eine vergleichende Analyse zwei genetisch identischer Mäuse stellt statistisch das Äquivalent einer vergleichenden Analyse von 168 genetisch verschiedenen Traumapatienten dar (Osuchowski, Remick et al. 2014).

Die Maus als Modell ist immunologisch gut charakterisiert, so ist ein breites Portfolio von kommerziell verfügbaren mausspezifischen Antikörpern für durchflusszytometrische Färbungsverfahren erhältlich. Die Verfügbarkeit genetisch modifizierter, defizienter Mausstämme (CD40L, P-Selektin) ein weiterer Vorteil für die Analyse des direkten Zell-Zellkontakts über CD40L und P-Selektin nach Trauma (Tsukamoto and Pape 2009).

Besonders der C57BL/6N-Mausstamm ist seit seiner Entwicklung Mitte des 20. Jahrhundert in der immunologischen Forschung etabliert und dient als Grundlage für die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Studien (Song and Hwang 2017). Auch wegbereitende Studien zum Verständnis der Rolle der CD4⁺ Tregs in traumatischem Kontext wurden im C57BL/6J-Mausstamm durchgeführt (Murphy, Choileain et al. 2005, Purcell, Dolan et al. 2006, Hanschen, Tajima et al. 2011, Hanschen, Tajima et al. 2012). Die Grundsatzbeweisstudie von Bergmann et al., auf die diese Dissertationsarbeit in Teilen aufbaut, zeigte erstmals eine posttraumatische Interaktion von Thrombozyten und

CD4⁺ Tregs im C57BL/6N-Mausstamm in einem Verbrennungsmodell (Bergmann, Hefele et al. 2016). Aus Gründen der Vergleichbarkeit und zur Analyse der Effekttärke wurde in dieser Arbeit aus diesem Grund a priori ebenfalls der C57BL/6N-Mausstamm genutzt.

Zudem konnten entscheidende Beobachtungen in der Forschung zu Mechanismen der posttraumatisch-inflammatorischen CD4⁺ Treg-Biologie sowohl in murinen als auch humanen Studien gezeigt werden. Eine posttraumatische Erhöhung des CD4⁺ Treg-Anteils konnte im hyperinflammatorischen Zustand von Venet und Mitarbeitern auch im Menschen gezeigt werden (Venet, Pachot et al. 2004). Auch die gesteigerte Expression von Aktivitätsmarkern der CD4⁺ Tregs bei Hyperinflammation konnte von Guignant und Koautoren in humanen Studien gezeigt werden (Guignant, Lepape et al. 2011). Dies lässt bis zu einem gewissen Grad die Konzeption von Hypothesen zur menschlichen CD4⁺ Treg-Biologie basierend auf den Ergebnissen experimenteller muriner Studien zu.

Die beschriebenen Vorteile durch die Verwendung des in der polytraumaimmunologischen Forschung gut etablierten C57BL/6N-Mausmodells bilden damit die Basis für dessen Einsatz in dieser hypothesengenerierenden Arbeit zur Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über einen direkten Zell-Zellkontakt-Mechanismus.

9.1.2 Narkose und Analgesie

Die Allgemeinanästhesie in dem angewendeten Verbrennungsmodell wurde mit Ketamin/Xylazin durchgeführt (siehe 7.6.1). Diese Kombination ist im Rahmen des murinen Verbrennungsmodell gut etabliert (Abdullahi, Amini-Nik et al. 2014). Eine ketaminhaltige Narkose hat gegenüber Alternativverfahren mit volatilen Anästhetika für das Verbrennungsmodell hämodynamische Vorteile. So ist eine Verbrennung von 25% der Körperoberfläche mit einem signifikanten Flüssigkeitsverlust verbunden. Das sympathomimetische Ketamin wirkt - im Gegensatz zu den vasodilatierend agierenden Inhalationsnarkotika - einer hämodynamischen Dekompensation entgegen. Allerdings inkludieren die Nebenwirkungen von Ketamin immunmodulatorische Effekte. So zeigten Studien, dass Ketamin eine antiinflammatorische Wirkung über eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nukleärer Faktor kappa-B), die Suppression von TNF- α , IL-6 und IL-8, sowie die Hemmung des TLR 4 ausübt (Kawasaki, Ogata et al. 1999, Welters, Hafer et al. 2010, Wu, Li et al. 2012). Auch Xylazin zeigte in einer in-vitro-Studie einen immunmodulatorischen Effekt über eine

gesteigerte IL-2-Produktion (Cupic, Colic et al. 2001). Eine vergleichenden Studie zu Narkoseverfahren im murinen Verbrennungsmodell empfiehlt jedoch eine Applikation von Ketamin/Xylazin und Buprenorphin gegenüber der Verwendung von Isofluran für eine bessere Balance in längeren Prozeduren, um signifikante sekundäre Immunmodulation zu verhindern (Al-Mousawi, Kulp et al. 2010). Zusammenfassend kann ein modulierender Effekt der Anästhesie auf das Immunsystems nicht exkludiert werden, allerdings lässt sich konstatieren, dass die Kombination von Ketamin mit Xylazin im murinen Verbrennungsmodell gut etabliert ist und somit eine gute Vergleichbarkeit mit der Literatur gewährleistet.

9.1.3 Traumamodell

Um einen standardisierten und damit reproduzierbaren immunologischen Reiz zu generieren, der eine polytraumatische Verletzung imitiert, wurde ein murines Verbrennungsmodell verwendet. Dieses Modell wurde 1975 ursprünglich mit einer Traumainduktion durch Verbrennung mittels einer Flamme vorgestellt (Stieritz and Holder 1975) und im Verlauf mechanistisch (Induktion einer drittgradigen Verbrennung durch Verbrühung) weiterentwickelt (Rumbaugh, Griswold et al. 1999). In dieser Arbeit wurde – entgegen dem Vorgehen in initialen Studien mit diesem Modell – keine subsequente Exposition zu Bakterien durchgeführt. Da im Versuchsablauf auch keine inneren bakterientragenden Organe verletzt wurden, wird in diesem Modell ein exklusiv steriler Reiz gesetzt. Allerdings wird durch dieses Vorgehen, per definitionem, auch keine polytraumatische Verletzung ausgelöst, weswegen Rückschlüsse zur Immunologie nach Polytrauma nur kritisch reflektiert zulässig sind. Zudem können beobachtete Mechanismen im murinen Organismus nach Verletzung nicht direkt auf den Mensch übertragen werden.

Aufgrund verschiedener Vorteile wurde sich dieser Arbeit trotzdem für dieses Modell unterschieden. Das Verfahren ist als Standardmodell zur Verbrennungsverletzung in der Literatur gut etabliert (Abdullahi, Amini-Nik et al. 2014). Zusätzlich wird das Modell - aufgrund seiner Eigenschaft, eine zuverlässige und konsistente Stimulation der CD4⁺ Tregs als Teil der Immunantwort im Rahmen von Trauma auszulösen – auch breit in der Literatur zur posttraumatischen Erforschung von immunologischen Immunprozessen verwendet (Choileain, MacConmara et al. 2005, Hanschen, Tajima et al. 2011). Somit ist eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Studien gesichert. Das Modell ist im Vergleich zu anderen Verletzungsmodellen relativ schonend für die Versuchstiere, da die Verbrühung eine Verbrennung dritten Grades induziert, bei der die Nervenenden der

Verletzungsstelle zerstört werden und damit das Schmerzempfinden ausgeschaltet wird. Trotz einer relativ geringen Mortalität < 5% imitiert das Modell valide die klinisch dysfunktionellen immunologischen Reaktionen schwerverletzter Patienten; hierzu haben Guo und Mitarbeiter eine Übersicht erstellt (Guo, Kavanagh et al. 2003). Zusammenfassend erlauben diese Argumente es, die Antwort eines Organismus auf einen traumainduzierten immunologischen Stimulus und deren Mechanismen im murinen Verbrennungsmodell zuverlässig zu untersuchen.

9.1.4 Messung der Aktivität der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

9.1.4.1 Phospho-Durchflusszytometrie

Um eine frühe posttraumatische CD4⁺ Treg-Aktivierung zu detektieren, wurde das Verfahren der Phospho-Durchflusszytometrie genutzt. Dieses Verfahren wurde bereits in Vorstudien speziell für die frühe Aktivierung des T-Zell-Rezeptors der CD4⁺ Tregs eingesetzt. Speziell konnte die Methode sowohl nach einer anti-CD3ε-Stimulation in-vitro als auch in einem murinen Verbrennungsmodell in-vivo solide etabliert werden (Hanschen, Tajima et al. 2011, Hanschen, Tajima et al. 2012). Die Phospho-Durchflusszytometrie zur Messung der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivierung wurde Alternativverfahren wie z.B. dem Western-Blotting aufgrund verschiedener methodischer Vorteile vorgezogen. Die hohe Durchsatzkapazität der Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, gleichzeitig ein schnelles, effektives und paralleles Screening verschiedener Zelltypen durchzuführen. Wie in 7.7.2.3 beschrieben erlauben spezifische Färbeverfahren und Gating-Strategien die akkurate Identifikation verschiedener Zelltypen sowie deren Subtypen, insbesondere die genaue Identifikation der CD4⁺ Tregs. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind quantifizierbar und erlauben so einen differenzierten Vergleich der Zellaktivierung. Außerdem kann durch die zeitnahe Messung nach Trauma die frühe posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs ohne Störeinflüsse bedingt durch die, den Alternativverfahren inhärente, artifizielle Aktivierung bestimmt werden.

Durch die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen (p)ZAP bzw. (p)PKC - als vergleichsweise TZR-spezifische Signalmoleküle (Baier, Telford et al. 1993, Meller, Elitzur et al. 1999, Hanschen, Tajima et al. 2012), im Detail aufgearbeitet in 9.1.4.4 - kann eine frühe CD4⁺ Treg-Aktivierung somit relativ effektiv und aussagekräftig analysiert werden.

9.1.4.2 Identifikation der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

Die genaue Identifikation der CD4⁺ Tregs ist in der Literatur weder eindeutig noch abschließend beschrieben und die phänotypische Klassifizierung unterliegt seit Entdeckung des Zelltyps wiederholten Änderungen (Abbas, Benoist et al. 2013). Es besteht ein Konsens in der Literatur, dass für CD4⁺ Tregs als T-Helferzell-Subtyp eine Charakterisierung über den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche notwendig ist. Nachdem festgestellt wurde, dass CD4⁺ Tregs über den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 identifiziert werden können (Fontenot, Gavin et al. 2003, Hori, Nomura et al. 2003), hat sich FoxP3 in der Literatur als sicherster Identifikationsmarker für die CD4⁺ Treg-Population etabliert (Sakaguchi, Vignali et al. 2013, Azimi, Aslani et al. 2016). Zudem ergab eine Analyse der prä- und posttranskriptionellen Expression von FoxP3 in CD4⁺ Zellen basierend auf mRNA-Messung und Western-Blot-Methodik, dass FoxP3 meist die Voraussetzung für die Expression von CD25 auf T-Helferzellen ist (Fontenot, Gavin et al. 2003). Initial wurden die CD4⁺ Tregs bei Ihrer Entdeckung von Sakaguchi und Mitarbeitern über die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, CD25, identifiziert, allerdings wurde festgestellt, dass die Expression nicht spezifisch für CD4⁺ Tregs ist (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995, Letourneau, Krieg et al. 2009). Auf Basis dieser Datenlage wurde in dieser Arbeit entschieden, CD4 und Foxp3 für die Identifikation der regulatorischen T-Zellen zu verwenden. Eine Unterscheidung zwischen *nTregs* und *iTregs* (Belkaid and Oldenhove 2008, Schmetterer, Neunkirchner et al. 2012, Kraj and Ignatowicz 2018) wurde nicht vorgenommen, da nicht feststeht, welche CD4⁺ Treg Subpopulation nach Trauma funktionell dominant ist und die Mechanismen für Interaktionen und Aktivierung somit in der CD4⁺ Treg-Population generell untersucht werden sollten. Andere regulatorische Zelltypen wie foxP3⁺ CD8⁺T-Zellen oder foxP3⁺ B-Zellen (Zhang, Kong et al. 2014) wurden in dieser Studie nicht untersucht.

9.1.4.3 Wahl des Zeitpunkts der posttraumatischen Aktivierung

Eine murine in-vivo Studie von Hanschen und Koautoren untersuchte Dynamik und zeitlichen Ablauf der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs und konnte in einer phospho-durchflusstrometrischen Messung feststellen, dass die relative Fluoreszenzintensität der intrazellulären Signalmoleküle (p-)ZAP-70 und (p-)PKC- θ zwischen 30 min und 60 min nach Trauma ihren Höhepunkt erreicht (Hanschen, Tajima

et al. 2011). Aus diesem Grund wurde in dieser Studie 60 min nach Trauma oder Scheinintervention post mortem (siehe 7.6) eine phospho-durchflusszytometrische Messung der Aktivierung der CD4⁺ Tregs durchgeführt (siehe 7.7).

Es wurde erwägt, die CD4⁺ Treg-Aktivierung zu späteren Zeitpunkten nach Trauma zu analysieren, um den klinischen dreigipfligen Mortalitätsstatistiken nach Polytrauma Rechnung zu tragen (Acosta, Yang et al. 1998). Initiale Studien zur CD4⁺ Treg-Aktivierung nach Trauma von Choileain und Koautoren konnten eine erhöhte CD4⁺ Treg-Funktion 7 Tage nach Trauma zeigen (Choileain, MacConmara et al. 2005). Eine Vorstudie zur Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten mit dem in dieser Studie verwendeten murinen Verbrennungsmodell von Bergmann und Koautoren konnte jedoch - in Abhängigkeit einer veränderten Oberflächenexpression der Marker CD44, CD69, L-Selektin, Glucocorticoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein (GITR) und TNFR-II - weder eine späte Aktivierung der CD4⁺ Tregs nach 7 Tagen, noch einen Unterschied der CD4⁺ Treg-Aktivierung in Abhängigkeit von Thrombozytendepletion zeigen (Bergmann, Hefele et al. 2016). Hanschen et al. konnten zeigen, dass die erhöhte Expression und Phosphorylierung von (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ sich schon nach vier Stunden wieder der Baseline annähert (Hanschen, Tajima et al. 2011). Auf Basis dieser Vorstudien wurde sich in dieser Arbeit aus Aspekten des Tierschutzes dagegen entschieden, die Mechanismen einer Aktivierung der CD4⁺ Tregs spät nach Trauma zu untersuchen.

9.1.4.4 Wahl der Marker der posttraumatischen Aktivierung

In dieser Arbeit wurde die Aktivität und Aktivierung der CD4⁺ Tregs über die frühe posttraumatische Expression und Phosphorylierung von Signalmolekülen der TZR-assoziierten CD4⁺ Treg Aktivierung - (p)ZAP-70, (p)PKC- θ -, wie in Studien zuvor etabliert, untersucht (Hanschen, Tajima et al. 2011, Hanschen, Tajima et al. 2012, Bergmann, Hefele et al. 2016).

ZAP-70 und seine aktivierte phosphorylierte Version (pZAP-70) sind essentielle Moleküle in der TZR-abhängigen T-Zell-Aktivierung. Nach Stimulation des TZR durch Bindung mit dessen spezifischem Antigen führt ein ZAP-70-abhängiger Signalweg über sekundäre Botenstoffe, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und anderen Enzymen zu T-Zellaktivierung (Mustelin and Taskén 2003). Im Speziellen werden nach Aktivierung des T-Zellrezeptors Aktivierungsmotive auf der Basis von Immunrezeptortyrosin (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAMs) der TZR-Untereinheiten

phosphoryliert und ZAP-70 wird zum TZR/CD3-Komplex rekrutiert (Mustelin and Taskén 2003). An Tyr-493 wird ZAP-70 durch die lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin-Kinase (engl. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; LcK) phosphoryliert (Chan, Dalton et al. 1995, Mustelin and Taskén 2003). Das phosphorylierte ZAP (pZAP) phosphoryliert sein Substrat, das Adapterprotein LAT (engl. *linker for activation of T-cells*, dt. Linker für die Aktivierung von T-Zellen) (Mustelin and Taskén 2003, Au-Yeung, Deindl et al. 2009). Dieses aktiviert sowohl die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) als auch Grb2/Sos/Ras-abhängige Signalwege (Grb2: engl. *growth factor bound receptor protein 2*, dt. wachstumsfaktorgebundenes Rezeptorprotein 2; Sos: engl. *son of sevenless*, [Eigennamen]; Ras: engl. *rat sarcoma* [Eigennamen]) sowie Gads/SLP-76/VAV-Signalwege (Gads: *Grb2-related adaptor down-stream of Shc*, dt. SHC nachgelagerter Grb2-verwandter Adaptor; SLP-76: engl. *SH2-domain-containing leucocyte protein of 76 kDa*, dt. SH2-Domäne-enhaltendes Leukozytenprotein von 76kDa; VAV = Protoonkogenprodukt) (Mustelin and Taskén 2003). Diese Signalwege resultieren über eine Aktivierung der Ca²⁺/IP₃ (Inositoltrisphosphat)-Signalkette, Ras/Raf/ERK-Signalwege (Raf: engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma* [Eigennamen]; ERK: engl. *extracellular-signal regulated kinase*, dt. extrazelluläre signalregulierte Kinase) und RhoA-Signalwege (engl. *ras homolog gene family member A*, dt. Mitglied der ras-homologen Gen-Familie A) in Genregulation, Proliferation, Aktin-Reorganisation und Zytokinausschüttung - dem biophysiologicalen Korrelat einer Zellaktivierung (Mustelin and Taskén 2003).

Die Phosphorylierung des zweiten gewählten Aktivierungsparameters, PKC- θ , kann ZAP-70-abhängig und -unabhängig zu T-Zellaktivierung führen. Durch Aktivierung des TZR kommt es zu einer Protein-Tyrosin-Kinasen-Aktivierung, welche zu einer Phosphorylierung von PLC γ 1 führt (Thebault and Ochoa-Garay 2004, Hanschen, Tajima et al. 2012). Nach Membrantranslokation wird so der sekundäre Botenstoff Diacylglycerol (DAG) produziert, der PKC- θ phosphoryliert. Phosphoryliertes PKC- θ führt letztendlich sowohl über eine Aktivierung der Transkriptionsmoleküle NF- κ B und Aktivator-Protein 1 (engl. activator-Protein 1, AP-1) (Isakov and Altman 2002, Thebault and Ochoa-Garay 2004) als auch über eine bekannte Synergie mit Calcineurin zu Aktivierung von N-FAT (engl. nuclear factor of activated T-cells, dt. nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) und IL-2-Transkription und damit zur T-Zellaktivierung (Werlen, Jacinto et al. 1998, Thebault and Ochoa-Garay 2004). Damit kann PKC- θ -abhängige Signaltransduktion TZR abhängig und TZR-unabhängig zur T-Zell-Aktivierung führen (Isakov and Altman 2002, Thebault and Ochoa-Garay 2004)). Unabhängig von ZAP-70

kann PKC- θ auch über eine kostimulatorische CD28-B7 Bindung und die damit verbundene Aktivierung der Lck phosphoryliert werden (Hayashi and Altman 2007, Hanschen, Tajima et al. 2012). Die Relevanz von PKC- θ im T-Zellaktivierungsprozess wurde untersucht; so zeigte eine murine Studie, dass PKC- θ -Defizienz mit einem selektiven T-Zell-Aktivierungsdefekt einhergeht (Sun, Arendt et al. 2000). Funktionell wirkt die PKC- θ in CD4⁺ Tregs über eine negative Feedbackschleife vorwiegend hemmend auf deren suppressive Funktion (Zanin-Zhorov, Ding et al. 2010). Im murinen Verbrennungsmodell konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden, dass (p)ZAP und (p)PKC der CD4⁺ Tregs nach Trauma in der Phospho-Durchflusszytometrie erhöht exprimiert und phosphoryliert werden (Hanschen, Tajima et al. 2011).

In die CD4⁺T-Zell-Aktivierung involvierte Oberflächenmoleküle wie CD44, CD69, L-Selektin, GITR und TNFR-II wurden nicht eingesetzt, da in einer Arbeit von Bergmann und Mitarbeitern kein posttraumatischen Anstieg der Aktivierungsmarker im relevanten Beobachtungszeitraum beobachtet werden konnte (Bergmann, Hefele et al. 2016).

Diese Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus diesen Vorstudien demonstrieren, dass ZAP-70 und PKC- θ -Expression und Phosphorylierung geeignete Parameter sind, um eine CD4⁺ Treg-Zellaktivierung zu bewerten.

9.1.4.5 Standardisierung der Fluoreszenzintensitäten über eine relative Fluoreszenzintensität

Um die Bedingungen für eine hochqualitative Messung zu optimieren, wurde der MACSQuant® Analyzer mittels MACSQuant® Calibration Beads kalibriert und Prozesse wie Materialentnahme, Zellaufreinigung, Färbung, Prozessierung im Durchflusszytometer und Auswertung über Gatingstrategien standardisiert.

Trotz dieser Vorkehrungen unterliegen die Proben dem Störeinfluss der probenspezifischen Autofluoreszenz. Dieses Phänomen wird hervorgerufen durch die Präsenz von Kollagen und Elastin, NADPH und Flavin Koenzymen sowie Zellorganellen wie Mitochondrien und Lysosomen (Monici 2005). Zudem ist die Autofluoreszenz zelltyp-spezifisch und wird des Weiteren beeinflusst durch Zellprozessierung und Manipulationsvorgänge (Hulspas, O'Gorman et al. 2009). In dieser Dissertationsarbeit wurde ein intraindividuellem Zusammenhang von Autofluoreszenz und Fluoreszenzintensität der Proben (pro Versuchstier) beobachtet. So korreliert die Höhe der Autofluoreszenz (= *MFI ungefärbte Kontrolle*) mit der Höhe Fluoreszenzintensität der gefärbten Proben (= *MFI antikörpergefärbte Probe*) - ein interindividuelles Muster ist jedoch nicht zu beobachten gewesen (siehe 7.7.2.4). Um diesen Störeffekt zu

minimieren, wurde die relative Fluoreszenzintensität berechnet, welche die Höhe der Autofluoreszenz über eine intraindividuelle Adjustierung der MFI auf die Autofluoreszenz der ungefärbten Kontrolle herausrechnet (siehe 7.7.2.4). Der Einsatz einer ungefärbten Kontrolle zur Korrektur der Autofluoreszenz wird von Hulspas und Koautoren empfohlen (Hulspas, O'Gorman et al. 2009). Auch die Bildung einer relativen Fluoreszenzintensität zur Korrektur von den Einflüssen einer Autofluoreszenz ist beschrieben, Hanschen und Koautoren führten beispielsweise die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität über eine Subtraktion der MFI einer Kontrollgruppe (CD4-, foxP3- und Alexa-Färbung, jedoch keine Färbung mit einem intrazellulären Antikörper) von der MFI der intrazellulär angefärbten Proben (CD4-, foxP3- und Alexa-Färbung sowie (p)ZAP/(p(PKC)-Färbung) durch (Hanschen, Tajima et al. 2011). In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die RFI jedoch über die Bildung eines Verhältnisses zwischen MFI der gefärbten Proben und der Autofluoreszenz gebildet, in der die Autofluoreszenz für alle intrazellulär gefärbten Proben mathematisch auf 1 normiert wird, um eine interindividuelle Vergleichbarkeit optimal zu gewährleisten. Die hier angewendete Normierung durch Verhältnisbildung bei der RFI-Berechnung ist in der Literatur so beschrieben (Venkateswarlu, Tamizh et al. 2015, Nagaya, Nakamura et al. 2016), im Zusammenhang der Phospho-Durchflusszytometrie nach Trauma stellt sie jedoch eine neuartige Methodik dar.

9.1.4.6 Limitationen Phosphodurchflusszytometrie

Trotz der Verwendung eines etablierten Verfahrens zu Messung der Aktivität der CD4⁺ Tregs geht die Verwendung der beschriebenen Methodik - trotz der zahlreichen methodischen Vorteile, mit gewissen Limitationen einher. Eine genauere Untersuchung der molekularen Aktivierung der CD4⁺ Tregs - gemessen am intrazellulären Prozess der Phosphorylierung - wäre mit prinzipiell weiteren Einsichten hinsichtlich der CD4⁺ Treg-Aktivierung verbunden gewesen. So wäre es denkbar gewesen, den tatsächlichen Anteil der durch Phosphorylierung aktivierten Signalmoleküle zu eruieren - z.B. über einen prä- und posttraumatischen Vergleich des Verhältnisses der phosphorylierten Signalmoleküle mit den nicht-phosphorylierten Signalmolekülen (MFI_{pZAP}/MFI_{ZAP} oder MFI_{pPKC}/MFI_{PKC}). Dies ist mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik jedoch nicht möglich. Die phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Versionen von ZAP-70 und PKC- θ unterscheiden sich allerdings nur durch einen Phosphatrest an den Molekülen (Hayashi and Altman 2007, Au-Yeung, Deindl et al. 2009). Die derzeit verfügbaren

Antikörper können eine Trennschärfe dieser Spezifität nicht garantieren. So erkennen die eingesetzten Antikörper gegen die nicht-phosphorylierten Signalmoleküle das Zielmolekül nach Herstellerinformation (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) unabhängig von seinen posttranslationalen Modifikationen und binden somit unspezifisch, sowohl an ZAP-70/pZAP-70 als auch an PKC- θ /pPKC- θ . Unabhängig von dieser Limitation kann auch über das eingesetzte Messverfahren im Rahmen einer vergleichenden Analyse wertvolle Information durch Vergleiche der Ergebnisse in Scheinintervention und Trauma bei Wildtyp- und Genknockouttieren generiert werden.

9.1.5 Rotationsthromboelastometrie

Zu Untersuchung der Rolle des direkten Zell-Zellkontakts als Mechanismen einer reziproken Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten in dieser Arbeit war es eine wichtige Frage, wie sich die Aktivierung und Funktion der Thrombozyten nach Knockout von potenziellen Interaktionswegen verändert. Im klinischen Alltag geben unter den Standardparametern vorwiegend die Thrombozytenzahl und die Blutungszeit eine Auskunft über die Funktion der Thrombozyten. In der Traumasituation mit der potenziellen Inzidenz einer traumainduzierten Koagulopathie (TIC) ist jedoch eine spezifischere Bewertung der thrombozytären Funktion notwendig. Diese Notwendigkeit wird zunehmend im klinischen Alltag identifiziert. Während die TIC historisch über die Veränderung klassischer Gerinnungsparameter wie der INR und der partiellen Thromboplastinzeit (engl. *partial thromboplastin time*, PTT) definiert wurde (Brohi, Singh et al. 2003), werden Detektion und Management der TIC aktuell zusätzlich über viskoelastische Verfahren wie TEG oder ROTEM[®] gesteuert (Burggraf, Payas et al. 2015). Während die INR und PPT zwar die Patienten mit der höchsten gerinnungsstörungsbedingten Mortalität nach Trauma identifizieren können (Burggraf, Payas et al. 2015), bieten Standardlaborverfahren keine Möglichkeit einer Echtzeitmessung, keine Messung der Gerinnungsfaktordefizienzen und keine Analyse der Effekte von Hypothermie auf die Hämostase und sie ermöglichen keine Bewertung der Fibrinolyse und Thrombozytenfunktion (Haas, Fries et al. 2015). Viskoelastische Verfahren wie ROTEM[®] erheben einen umfassenden Status der Gerinnung, indem sie eine Identifikation spezifischer mechanistischer Defizite der Gerinnung sowie Thrombozytopenie, Faktordefizienz, Einflüssen von Heparin, Fibrinogenmangel und Hyperfibrinolyse ermöglichen (Luddington 2005) und so eine Basis bieten für eine gezielte Behandlung (Burggraf, Payas et al. 2015, Gonzalez, Moore et al. 2016). Die Bewertung der Parameter CT, MCF, CFT und α -angle ermöglicht somit eine solide

Evaluation der dynamischen hämostatischen Funktion; vor allem die MCF gilt als Marker eine thrombozytären Dysfunktion (Keene, Nordmann et al. 2013). Zudem sind mit dem Cup&Pin mini[®]-Set Materialien für die Durchführung experimenteller muriner Studien mittels Rotationsthromboelastometrie verfügbar und die Messung der Gerinnungsfunktion mittels ROTEM[®] ist in murinen Studien etabliert (Bergmann, Hefele et al. 2016, Boudreau, Johnson et al. 2017, Bock, Bergmann et al. 2018, Williams, Neder et al. 2019). Diese Überlegungen dienten als Basis, die thrombozytäre Seite der reziproken Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten via Rotationsthromboelastometrie zu messen.

9.1.6 Limitation der Methodik

Die Untersuchung der Forschungsfragen in einem murinen Verbrennungsmodell unter Verwendung gendefizienter Tiere wie in 7.9. beschrieben weist neben den in 9.1.1. diskutierten Vorteilen auch einige Einschränkungen auf.

So ergeben sich zum Einen Limitationen aus einem Versuchsprotokoll mit gendefizienten Tieren. Sowohl CD40L als auch P-Selektin sind auf verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert. Auch wichtige Interaktionspartner von Thrombozyten und CD4⁺ Tregs wie Endothelzellen oder antigenpräsentierende Zellen interagieren über CD40L und P-Selektin und deren Rezeptoren mit ihrem Interaktionspartnern (Furie, Furie et al. 2001, Schonbeck and Libby 2001, Elgueta, Benson et al. 2009, Kutlar and Embury 2014). Ob die Effekte eines CD40L- oder P-Selektin Genknockouts auf die posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs exklusiv durch die direkte Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4⁺ Tregs bedingt wird, lässt sich durch ein Knockout-Modell, das alle beteiligten Zellen gleichermaßen impaktiert, somit nicht abschließend klären. Denkbar sind demnach Szenarien, in denen CD40L und P-Selektin APZ-vermittelt oder endothelvermittelt einen Einfluss auf die Aktivierung der CD4⁺ Tregs ausüben. Um die Frage einer exklusiven Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über die untersuchten Signalwege zu beurteilen, wären gegebenenfalls erweiterte, im Folgenden skizzierte Versuche notwendig.

Zur Beurteilung der Rolle von dezidiert thrombozytärem CD40 und P-Selektin in der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs wäre eine in-vitro Ko-Inkubation von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten mit anschließender Phospho-Durchflusszytometrie denkbar gewesen, um die exklusive direkte Interaktion der beiden Zelltypen über diese Signalwege zu untersuchen.

Zudem wäre ein adoptiver Transfers mittels einem Depletions- und Infusionsmodell eine Möglichkeit, die dezidierte reziproke Abhängigkeit der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs und der thrombozytären Funktion zu bewerten. In einem solchen Versuchsaufbau könnten im Thrombozyten oder CD4⁺ Tregs in Wildtyp-Tieren depletiert und mit den Thrombozyten oder CD4⁺ Tregs von CD40/CD40L- oder P-Selektin/PSLG-1-defizienten Tieren infundiert werden. Auf diese Weise könnte eine Bewertung der CD4⁺ Treg-Aktivierung sowie hämostatischer Parameter exklusiv für die direkte Interaktion von Thrombozyten und CD4⁺ Tregs untersucht werden. Allerdings handelt es sich in der vorliegenden Dissertationsarbeit um eine hypothesengenerierende Studie, zu deren Beginn nicht klar war ob CD40L und P-Selektin überhaupt eine Rolle in der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivierung sowie Hämostase spielen. So schien es von ethischem Standpunkt nicht gerechtfertigt, zusätzliche Versuchstiere in dieser Arbeit zu verwenden; zukünftige Studien mit diesem Versuchsdesign sind jedoch durchaus vorstellbar.

Aus statistischer Sicht kann des Weiteren die Gruppenstärke der durchgeführten Analyse kritisch diskutiert werden. Die a-priori durchgeführte Poweranalyse ergab bei einer biologisch relevanten Differenz von 20%, α von 0,05 und β von 0,2 eine Gruppenstärke von jeweils sechs Tieren. Trotz einer Verwendung von mind. zwei Reservetieren wurde diese Gruppenstärke in Einzelgruppen in der finalen Analyse jedoch teilweise unterschritten. Grund hierfür war zum einen die intraoperativ erhöhte Letalität der verwendeten Knockouttiere verglichen mit Wildtyptieren, auf deren Letalitätsdaten die Poweranalyse durchgeführt wurde. Des Weiteren reduzierte die materialbedingte Anfälligkeit des Versuchsaufbaus die Gruppenstärke für die finale Analyse. Insbesondere bei der Rotationsthromboelastometrie konnten nicht alle Versuchstiere in der finalen Analyse eingeschlossen werden. Aufgrund der erhöhten Clottingrate des murinen Bluts im für humanes Blut konzipierten ROTEM[®] Messgerät war eine Auswertung in einzelnen Fällen unmöglich. Zudem konnten, aufgrund der grenzwertig geringen zu gewinnenden Blutmenge bei der intrakardialen Blutentnahme, nach Applikation der Exklusionskriterien nicht alle Individuen eingeschlossen werden. Auch bei der Auswertung der phospho-durchflusszytometrischen Daten mussten aufgrund der Exklusionskriterien (siehe 7.7.2) einzelne Proben von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit einer Wiederholung der Experimente zur Erweiterung der Gruppenstärke wurde kritisch evaluiert; aufgrund des Herstellungsstopps des PKC θ (P632) (#12206) Antikörpers für die Durchflusszytometrie konnte eine Erweiterung der

Studiengruppe mit derselben Methodik jedoch nicht durchgeführt werden. Prinzipiell besteht bei zu geringer Gruppenstärke somit ein erhöhtes Risiko für Fehler 2. Art. Bei der Untersuchung einer größeren Gruppenstärke könnten die beobachteten Tendenzen ggf. statistische Signifikanz erreichen und somit ein Verwerfen der Nullhypothese ggf. ermöglichen.

Als letzter Punkt lässt sich konstatieren, dass die Ergebnisse dieser Arbeit mit angewendetem Versuchsprotokoll zwar Informationen über die Mechanismen der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivierung generieren, es sich jedoch nicht unmittelbar klinische Empfehlungen aus den gewonnenen Erkenntnissen treffen lassen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die - im Kontext der posttraumatischen Hyperinflammation - protektiv angesehene Aktivierung der CD4⁺ Tregs durch CD40L- und P-Selektin-abhängige Signalwege beeinflusst wird. Klinisch entscheidend ist jedoch die tatsächliche posttraumatische immunsuppressive CD4⁺ Treg Effektorfunktion, die beispielsweise früh nach Trauma im Rahmen eines Suppressionsassays einer CD40L-defizienten CD4⁺ Treg-Population in Ko-Kultur mit konventionellen CD4⁺T-Zellen getestet werden muss.

Die Limitationen des Versuchsaufbaus zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Ergebnisse der durchgeführten Analyse als Basis für weitere Hypothesen verstanden werden können. Mit den vorgeschlagenen erweiterten Versuchprotokollen können die Einflüsse von CD40L und P-Selektin in der Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten in der Folge noch dezidierter evaluiert werden.

9.2 Diskussion der Ergebnisse

Eine Kurzform der Diskussion der Ergebnisse zur Aktivierung der CD4⁺ - Tregs im Lymphknotengewebe sowie der Veränderung der hämostatischen Parameter bei CD40L-Gendefizienz und P-Selectin-Gendefizienz wurden 2021 in der Zeitschrift *Central European Journal of Immunology* publiziert (Rupp, Bergmann et al. 2021).

9.2.1 Validität des Knockout-Modell

Wie in 7.2 beschrieben wurde ein murines Knockoutmodell verwendet. Vor der mechanistischen Untersuchung dieser Interaktion stellte sich demnach a priori die Frage, ob CD4⁺ Tregs in einem P-Selektin- und CD40L-defizienten murinen Organismus adäquat zu untersuchen sind. Murine Studien in der jeweiligen Defizienz postulieren, dass

sowohl P-Selektin als auch CD40L wichtig für die Entwicklung und Funktion der CD4⁺ Tregs sind (Kohm and Miller 2003, Guiducci, Valzasina et al. 2005, Spence and Green 2008). Deshalb musste vor einer Erörterung mechanistischer Zusammenhänge a priori suffizient geklärt werden, ob die Produktion und Funktionalität der CD4⁺ Tregs primär erhalten bleibt. Hierfür wurden die Daten der CD4⁺ Treg-Population aus dem durchgeführten Knockoutmodell quantitativ analysiert (siehe 8.1) und mit Studien aus der Literatur zur Population der CD4⁺ Treg und deren Funktion bei entsprechender Gendefizienz verglichen.

9.2.1.1 Die CD4⁺ Treg-Population bei CD40L-Gendefizienz

Eine quantitative Analyse der Daten der Zellpopulationen in CD40L-Defizienz zeigte eine auf 29% reduzierte Gesamtzellzahl in den Lymphknoten und eine auf 30% reduzierte CD4⁺ Treg-Zahl, jedoch einen zu Wildtyptieren fast identischen Prozentsatz der CD4⁺ Treg Subpopulation (siehe 0). Diese Ergebnisse decken sich mit den Studien aus der Literatur. Renshaw und Mitarbeiter beobachteten in einer CD40L-Knockout-Studie an Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund, dass die Gesamtzellzahl in Lymphknoten circa zwei- bis dreifach erniedrigt ist, die prozentuale Aufteilung der T-Zell Subtypen jedoch vergleichbar mit derjenigen bei Wildtyptieren ist (Renshaw, Fanslow et al. 1994). In einem murinen CD40-Knockout-Modell von Guiducci und Koautoren wurde eine um 50 bis 80% reduzierte CD4⁺ Treg-Zahl (identifiziert über CD4- und CD25-Positivität) in peripherem Blut, Milz und Thymus gemessen (Guiducci, Valzasina et al. 2005). Auch Smook und Koautoren berichteten eine 46%ige Reduktion der absoluten Zahl der CD4⁺ Treg-Subpopulation in einem murinen CD40L-Knockout (Smook, Heeringa et al. 2005). Des Weiteren konnten Spence und Koautoren sowohl für CD40 als auch CD40L-Knockout eine 50-60%ige Reduktion der absoluten Population der CD4⁺ Tregs beschreiben (Spence and Green 2008). Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der Literatur zu CD40L-Knockout lässt die Schlussfolgerung zu, dass die CD4⁺ Treg-Zahl zwar reduziert ist, jedoch ausreichend CD4⁺ Tregs für eine mechanistische Untersuchung vorliegen.

9.2.1.2 Die CD4⁺ Treg-Population bei P-Selektin Gendefizienz

Ein Studie von Kohm und Ko-Autoren in einem murinen P-Selektin-Knockout-Modell zeigte, dass die CD4⁺ Treg-Zahlen (identifiziert über CD4- und CD25-Positivität) ca. 60-

80% erhöht und damit signifikant größer sind als in Wildtyptieren (Kohm and Miller 2003). Mit einer in dieser Dissertationsarbeit gemessenen 1,68-fach höheren CD4⁺ Treg-Zahl in Lymphknoten und eine 1,39-fach höheren CD4⁺ Treg-Zahl in der Milz (siehe 8.1.2.2), konnten die von Kohm et al. publizierten Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit auch bei einer Identifikation der CD4⁺ Treg über CD4- und FoxP3-Positivität reproduziert werden. Angiari und Koautoren konnten in einer murinen PSGL-1-Knockout-Studie in einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis zeigen, dass die Prozentsätze der CD4⁺ Treg-Population (identifiziert über CD4- und CD25-Positivität) sich nicht signifikant von derjenigen in Wildtyptieren unterscheidet (Angiari, Rossi et al. 2013). In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde auch bei CD4⁺ Treg-Identifikation über CD4 und foxP3 festgestellt, dass die Prozentzahl der CD4⁺ Tregs in P-Selektin Defizienz mit einem Unterschied von 2,4% in Lymphknoten und 2,9% in der Milz nicht deutlich von den Prozentsätzen der Wildtypkontrollgruppe abweicht (siehe 8.1.2.2). Das von Kohm und Koautoren beobachtete Wachstum der absoluten CD4⁺ Treg-Population bei P-Selektin Defizienz (Kohm and Miller 2003) wurde auf Basis der in dieser Dissertationsarbeit gewonnenen Erkenntnisse einer höheren absoluten Zellzahl bei ähnlicher prozentualer Verteilung der Subpopulationen zugeordnet.

9.2.1.3 Limitationen

Wie in 7.2. beschrieben, wurde die Aktivierung der CD4⁺ Tregs in der vorliegenden Arbeit in einem Gen-Knockout Modell untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass CD40L oder P-Selektin schon im Entwicklungsprozess der CD4⁺ Tregs - z.B. Selektion, Differenzierung oder Stoffwechselentwicklung der CD4⁺ Tregs - eine essentielle Rolle spielen und Teilschritte der Entwicklung koordinieren, die für die spätere Aktivierung und Effektorfunktion der CD4⁺ Tregs essentiell sind. Dies würde bedeuten, dass die Signaltransduktion über CD40L und P-Selektin zwar in vorgeschalteten Prozessen, nicht jedoch im letztendlichen Aktivierungsvorgang nötig ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen wäre - bei gleichem experimentellen Setup hinsichtlich Intervention und Messmethoden - zusätzlich eine Antikörper-vermittelte Blockade des CD40L und P-Selektin der CD4⁺ Tregs als Vergleichsgruppe zu den Knockout-Versuchen mit den Zielparametern prä- und posttraumatische Fluoreszenzintensität denkbar. Ergebnisse aus Studien deuten jedoch darauf hin, dass eine Antikörperblockade - beispielsweise im Falle von CD40L - eine zügige Reduktion der CD4⁺ Treg-Subpopulation bewirkt (Guiducci,

Valzasina et al. 2005, Seijkens, Engel et al. 2010, Li, Carlson et al. 2011). Dies impliziert, dass Vergleiche von absoluten Ergebnissen der Fluoreszenzintensität zwischen einer Knockoutgruppe und einer zusätzlichen Studiengruppe, in der eine Antikörperblockade durchgeführt wird, nicht möglich sind. Aufgrund der absoluten Reduktion der Zellzahl und dadurch Beeinflussung der prä- und posttraumatischen Fluoreszenzintensität existiert die erforderliche Trennschärfe für die Diskrimination des Einflusses der Moleküle, bezogen auf Proliferation und Funktion, in einem solchen Versuchsaufbau nicht. Die solide Basis in der Literatur zur erhaltenen Funktion der CD4⁺ Tregs bei CD40L- oder P-Selektin Defizienz respektierend, wurde diese Fragestellung demnach in der vorliegenden Dissertationsarbeit nicht speziell adressiert.

9.2.1.4 Schlussfolgerung

Die Analyse der quantitativen Daten zur CD4⁺ Treg-Population sowie die Analyse der Literatur zu Generation und Funktion der CD4⁺ Tregs in den betreffenden Gen-Knockouts lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Voraussetzungen dafür, eine Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über den direkten Zellkontakt zu untersuchen, im vorliegenden Gen-Knockoutmodell erfüllt wurden. Daher wurde diese Methode alternativen Versuchsprotokollen - wie z.B. einer antikörpervermittelten Blockade mit anti-CD40L- und anti-P-Selektin-Antikörpern - vorgezogen.

9.2.2 Posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte in Wildtyptieren eine signifikante posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs drainierender Lymphknoten eine Stunde nach Verbrennungsverletzung beobachtet werden (siehe 8.2). Diese Ergebnisse ordnen sich in aktuelle Konzepte der posttraumatischen regulatorischen T-Zellaktivierung ein.

9.2.2.1 Mechanismus der Aktivierung

Aktuelle Theorien zur posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs basieren auf der von Matzinger und Koautoren formulierten „*Danger*“-Theorie (dt. „Gefahren“-Theorie) (Matzinger 1994). Diese Theorie postuliert, dass eine traumatische Verletzung zu einer Freisetzung von Alarminen führt (Oppenheim and Yang 2005, Oppenheim, Tewary et al. 2007). Alarmine sind in diesem Kontext definiert als Antigene endogenen Ursprungs, sog. DAMPs, oder exogenen Ursprungs, sog. PAMPs (Oppenheim and Yang 2005, Oppenheim, Tewary et al. 2007). Diese Antigene provozieren eine Immunantwort, sobald

sie nach einem Trauma durch das körpereigene Immunsystem erkannt werden (Oppenheim, Tewary et al. 2007, Hirsiger, Simmen et al. 2012). Diese Erkennung kann beispielsweise über chemotaktische Rezeptoren oder APZ gelingen und aktiviert zelluläre und humorale Komponenten der angeborenen oder erworbenen Immunabwehr (Oppenheim and Yang 2005). Innerhalb der erworbenen Immunabwehr gehören $CD4^+$ Tregs zu den posttraumatisch primär aktivierten T-Zell-Subtypen (Hanschen, Tajima et al. 2011). Bereits Arbeiten von Murphy et al. sowie Choilean et al. konnten 2005 zeigen, dass $CD4^+$ Tregs nach Trauma aktiviert werden und die immunologische Antwort des Organismus beeinflussen (Choileain, MacConmara et al. 2005, Murphy, Choileain et al. 2005). Gängige Theorien – wie von Stoecklein und Mitarbeitern zusammengefasst (Stoecklein, Osuka et al. 2012) - gehen davon aus, dass Alarmine $CD4^+$ Tregs entweder über eine direkte Signaltransduktion über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) wie TLRs oder indirekte Signaltransduktion über Alarmin-Präsentation auf APZ aktivieren.

Die frühe posttraumatische Aktivierung der $CD4^+$ Tregs beginnend ab 15 Minuten nach Trauma konnte erstmal in einer Arbeit von Hanschen und Mitarbeiter im murinen Verbrennungsmodell gezeigt werden (Hanschen, Tajima et al. 2011). Basierend auf der Phospho-Durchflusszytometrie, wurde bereits gezeigt, dass die $CD4^+$ Treg-Aktivierung tatsächlich T-Zell-Rezeptor-abhängig über eine messbare Erhöhung der intrazellulären TZR-Downstreammoleküle (p)ZAP und p(PKC) stattfindet (Hanschen, Tajima et al. 2012). Anders als in dieser Pilotstudie, bei der in-vivo bakterielles Superantigen für eine Stimulation der $CD4^+$ Tregs genutzt wurde (Hanschen, Tajima et al. 2012), wurde in Folgestudien, ebenso wie in der vorliegenden Dissertationsarbeit (siehe 7.6), eine nicht-infektiöse sterile $CD4^+$ Treg-Aktivierung durch endogene Alarmine induziert (Hanschen, Tajima et al. 2011, Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018). Die vorliegende Dissertationsarbeit bestätigt zudem die Ergebnisse kürzlich durchgeführter Experimente im murinen Verbrennungsmodell, die eine $CD4^+$ Treg-Aktivierung zwei Stunden nach Trauma propagieren (Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018), nun ebenfalls für einen posttraumatischen Messzeitpunkt von einer Stunde nach Verletzung. Die vorliegende Dissertationsarbeit unterstützt, kumuliert mit den vorausgegangenen Studien, somit die Theorie, dass $CD4^+$ Tregs TZR-abhängig durch körpereigene Antigene, DAMPs, aktiviert werden. Denkbar ist demnach, dass über diesen Mechanismus alloantigen-unabhängig eine Erkennung der DAMPs durch APZ (Oppenheim and Yang 2005) und eine Präsentation der DAMPs auf deren MHC-II-

Rezeptoren für den TZR induziert wird. Die vorliegende Dissertation kann die mechanistische Rolle der DAMPs für die CD4⁺ Treg-Aktivierung nicht abschließend klären, beschreibt aber im Folgenden (siehe 9.2.3.2) einen möglichen Mechanismus via CD40L-abhängiger Kostimulation auf die TZR-abhängige Aktivierung.

9.2.2.2 Lokalisation der Aktivierung

In dieser Arbeit wurde eine CD4⁺ Treg-Aktivierung sowohl in den drainierenden Lymphknoten als auch der Milz gemessen (siehe 8.2). Die Messung einer frühen erhöhten Aktivität von CD4⁺ Tregs in drainierenden Lymphknoten stützt das Konzept, dass CD4⁺ Tregs lokal durch gewebeassoziierte Antigene wie DAMPs, die auf regionären APZ präsentiert werden, aktiviert werden (Choileain, MacConmara et al. 2005). Initiale Studien im Verbrennungsmodell anderer Autoren beschrieben, dass eine frühe CD4⁺ Treg-Aktivierung primär limitiert auf die drainierenden Lymphknoten bleibt (Hanschen, Tajima et al. 2011, Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018). Doch Studien zur Kinetik der CD4⁺ Treg-Aktivierung von Hanschen und Mitarbeitern ergaben Hinweise auf eine - wenn auch nicht signifikante - posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ Tregs in der Milz (Hanschen, Tajima et al. 2011). Auch Studien von Bock und Mitarbeitern zeigten eine frühe nicht-signifikante Aktivierung von CD4⁺ Tregs nach Trauma (Bock, Bergmann et al. 2018). In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte im posttraumatischen Kontext erstmals statistisch signifikant gezeigt werden, dass milzbasierte CD4⁺ Tregs nach Trauma aktiviert werden (siehe 8.2). Dies unterstützt aktuelle Konzepte zum Migrations- und Stoffwechselverhalten der CD4⁺ Tregs, welche davon ausgehen, dass CD4⁺ Tregs zwischen lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe im gesamten Organismus rezirkulieren und stimulusabhängig proliferieren und Effektorfunktionen ausüben (Li and Rudensky 2016). Im traumatischen Kontext konnten Choileain und Mitarbeiter zudem in einer murinen Studie zeigen, dass bei CD4⁺ Treg-depletierten Versuchstieren nach Verbrennungstrauma signifikant höhere Level an proinflammatorischen INF-gamma im Milzgewebe messbar sind (Choileain, MacConmara et al. 2005). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass eine Verletzung im Verlauf auch eine erhöhte immunsuppressive Aktivität milzbasierter CD4⁺ Tregs induzieren könnte. Zusammenfassend findet die Hauptantwort des Immunsystems posttraumatisch lokal in den regionären drainierenden Lymphknoten statt; es können jedoch auch im zentralen Kompartiment in der Milz Änderung des Aktivitätszustandes der CD4⁺ Tregs registriert werden.

9.2.2.3 Limitationen

Obwohl die Arbeit neue Einsichten zu Lokalisation und Status des posttraumatischen Aktivierungszustand der CD4⁺ Tregs generiert, kann die Methodik kritisch diskutiert werden (siehe 9.1.4.6). Eine statistisch signifikante posttraumatische Aktivierung wird zwar für drei von vier getesteten Signalmolekülen erreicht, die biologische relevante Differenz von 20% wird jedoch nur für ein Signalmolekül erreicht. Zahlreiche vorhergehende Studien bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Wildtyptieren (Hanschen, Tajima et al. 2011, Bergmann, Hefele et al. 2016, Bock, Bergmann et al. 2018), eine größere Gruppenstärke hätte die Aussagekraft der Studie jedoch verstärkt.

Bzgl. des Mechanismus posttraumatischen CD4⁺ Treg Aktivierung generiert die vorliegende Arbeit zwar neue mechanistische Erkenntnisse zur Rolle der Thrombozyten als Interaktionspartner im direkten Zell-Zellkontakt, die in der Literatur propagierte zentrale Rolle der gewebeassoziierten Antigene, der DAMPs (Stoecklein, Osuka et al. 2012) kann durch diese Studie ist aber nicht abschließend geklärt.

Auch die Lokalisation der Immunantwort nach Trauma kann in dieser Studie nicht abschließend evaluiert werden. Der in der Literatur propagierten Annahme, dass die Lymphknoten die primäre Lokalisation der CD4⁺ Treg-Aktivierung sind, wird durch diese Studie nicht widersprochen. Ein TZR-abhängiger Aktivierungsmechanismus für milzbasierte CD4⁺ Tregs kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht propagiert werden. Die posttraumatische CD4⁺ Treg-Aktivierung muss vor dem Hintergrund verschiedener Konzepte der CD4⁺ Treg-Aktivierung über sowohl TZR-abhängige (Hanschen, Tajima et al. 2011, MacConmara, Tajima et al. 2011) als auch TZR-unabhängige Mechanismen (Szymczak-Workman, Workman et al. 2009) interpretiert werden; dies demonstriert das limitierte Verständnis der Mechanismen, Lokalisation und Kinetik der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivierung. Zudem differenziert diese Dissertationsarbeit nicht zwischen denen in 5.2.1.1 beschriebenen verschiedenen Typen der CD4⁺ Tregs. In der untersuchten posttraumatischen Aktivierung kann weder zwischen dem Ursprung der CD4⁺ Tregs (natürlich auftretende Tregs – nTregs, oder induzierte Tregs – iTregs) (Belkaid and Oldenhove 2008, Schmetterer, Neunkirchner et al. 2012, Kraj and Ignatowicz 2018) noch den funktionellen Subtypen (zentrale ruhende Tregs - cTregs, Effektor-Tregs - eTregs, memory-Tregs - mTregs) (Rosenblum, Gratz et al. 2011, Yamaguchi, Wing et al. 2011,

Cretney, Kallies et al. 2013, Campbell 2015) unterschieden werden und somit können keine generellen Hypothesen für deren individuelle Relevanz im traumatischen Kontext generiert werden. Vermutet werden kann lediglich, dass in dieser Arbeit vorwiegend die im sekundärlymphatischen Gewebe rezirkulierenden cTregs untersucht wurden.

Zudem kann keine Aussage zu den klinischen Konsequenzen der posttraumatischen CD4⁺ Treg-Aktivität getroffen werden.

9.2.2.4 Konsequenz der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

Basierend auf der Beobachtung, dass CD4⁺ Tregs posttraumatisch aktiviert werden, ergibt sich die Frage nach der Konsequenz dieser Aktivierung für die suppressive Funktion der CD4⁺ Tregs und damit assoziiert die Konsequenzen für den Gesamtorganismus nach Trauma. Klassischerweise wurde für die CD4⁺ Tregs eine protektive Rolle nach Trauma propagiert (Murphy, Choileain et al. 2005, Stoecklein, Osuka et al. 2012). So kontrollieren CD4⁺ Tregs im Kontext der traumabedingten immunologischen Dysbalance durch immunsuppressive Handlungsmechanismen einen hyperinflammatorischen Phänotyp nach Trauma, welcher im Rahmen der (Spät-)Mortalität nach Trauma eine signifikante Rolle spielt (Acosta, Yang et al. 1998, Zang, Dolan et al. 2004, Caretto, Katzman et al. 2010, Stoecklein, Osuka et al. 2012). Allerdings kann im Kontext posttraumatischer Immunsuppression, welche einen Risikofaktor für nosokomiale Infektionen darstellt, nicht von einer exklusiv protektiven Rolle der CD4⁺ Tregs über immunsuppressive Mechanismen ausgegangen werden (MacConmara, Maung et al. 2006). Eine supprimierte Reagibilität der CD4⁺ T-Effektorzellen des adaptiven Immunsystems geht mit einer verschlechterten Pathogenabwehr einher (O'Sullivan, Lederer et al. 1995). In Konzertierung mit den Dysfunktionen anderer Leukozyten ergibt sich für Patienten so posttraumatisch eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen (Adib-Conquy and Cavaillon 2008). Die Daten zeigen, dass nach Trauma bis zu 45% der Patienten auf Intensivstation eine nosokomiale Infektion erleiden (Hoover, Bochicchio et al. 2006). Während ältere immunologische Konzepte von einer sequentiellen Immundysfunktion mit primär hyperinflammatorischem und konsekutiv hypoinflammatorischem Phänotyp ausgehen (van Griensven, Krettek et al. 2003), propagieren aktuellere Konzepte eine gleichzeitige Aktivierung pro- und antiinflammatorischer Mechanismen (Stoecklein, Osuka et al. 2012), deren Überwiegen entweder zu einem SIRS aufgrund von posttraumatischer Hyperinflammation oder einem

CARS aufgrund von inadäquater Immunsuppression führen (Stoecklein, Osuka et al. 2012). Konsekutiv können beide dysregulatorischen Prozesse die Grundlage für die Entwicklung eines MODS bilden (Neunaber, Zeckey et al. 2011).

Auch im Zustand einer Hyperinflammation anderer Ätiologie, wie z.B. der Sepsis, ist die spezielle Rolle der CD4⁺ Tregs nicht abschließend geklärt. Es konnte in humanen und murinen Studien gezeigt werden, dass CD4⁺ Tregs über ihre gesteigerte Proliferation ein fester Teil der Antwort des Organismus auf den infektiologischen Stimulus im Rahmen einer Sepsis sind (Monneret, Debard et al. 2003, Scumpia, Delano et al. 2006, Wisnoski, Chung et al. 2007). Ein Konsens in der Literatur zu Rolle der CD4⁺ Tregs in diesem Kontext besteht nicht - einige Studien demonstrierten eine nachteilige Wirkung der CD4⁺ Tregs in diesem Kontext (Monneret, Debard et al. 2003, MacConmara, Maung et al. 2006), andere beobachteten keinen CD4⁺ Treg-assoziierten Effekt auf die Mortalität (Scumpia, Delano et al. 2006, Wisnoski, Chung et al. 2007) während eine weitere Studie im septischen Kontext von einer protektiven Wirkung ausgeht (Heuer, Zhang et al. 2005). Nicht nur die Protektivität der CD4⁺ Treg-vermittelten immunsuppressiven Prozesse im Generellen wird debattiert, sondern auch die historische propagierte exklusiv antiinflammatorische Natur der CD4⁺ Tregs wird zunehmend kontrovers diskutiert. Diese relativ aktuelle Entwicklung der wissenschaftlichen Diskussion basiert auf verschiedenen T-Zellstudien, die Zelltyp-Plastizität und proinflammatorische Wirkungen des CD4⁺ Treg-Zelltyps untersuchten. Im Zelldifferenzierungsprozess angewiesen auf TGF- β , wird die Population der CD4⁺ Tregs zunehmend in engem Zusammenhang mit dem ebenfalls auf TGF- β angewiesenen Th17-Zellen diskutiert (Korn, Bettelli et al. 2009). Der Th17-Subtyp kann über IL-17, IL-21 und IL-22 eine Entzündung induzieren (Korn, Bettelli et al. 2009). Korn et al. berichteten, dass die TGF- β -abhängige Differenzierung in den antiinflammatorischen CD4⁺ Treg-Subtyp oder den potenten proinflammatorischen TH17-Subtyp zytokinbasiert über IL-6 oder IL-21 gesteuert wird (Korn, Bettelli et al. 2009). Zusätzliches Potential für Diskussion in diesem Kontext ergab sich durch humane und murine Studien, die zeigten, dass auch differenzierte CD4⁺ Tregs proinflammatorische Funktionen wahrnehmen können. Diese Studien belegten, dass CD4⁺ Tregs bei einer gleichzeitigen Herabregulation des Transkriptionsfaktors foxP3 und einer Heraufregulation von Ror γ (dt. RAR-verwandtes Orphan-Rezeptor-Gamma, engl. *RAR-related orphan receptor gamma*) in Mäusen oder Rorc (in Menschen) proinflammatorisches IL-17 sezernieren können (Koenen, Smeets et al. 2008, Yang,

Nurieva et al. 2008, Valmori, Raffin et al. 2010, Guery and Hugues 2015). Auch eine Plastizität der Zelldifferenzierung im Sinne einer Umwandlung des Th17-Subtyps in einen CD4⁺ Treg-Subtyp wurde beschrieben (Obermajer, Popp et al. 2014). Diese Studien suggerieren komplexe dynamische Funktionen der CD4⁺ Tregs im Zusammenhang mit Th17-Zellen und stellen das Konzept der exklusiv antiinflammatorischen, protektiv agierenden CD4⁺ Tregs zunehmend in Frage. Auch deswegen besteht die Notwendigkeit, die Mechanismen einer CD4⁺ Treg-Aktivierung nach Trauma genauer zu verstehen, um die Rolle der CD4⁺ Tregs situationsspezifisch zu evaluieren.

9.2.3 Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei CD40L Gendefizienz

9.2.3.1 *CD40L als kostimulatorisches Moleküle in der Aktivierung von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen*

Wie in 5.2.1.4 beschrieben, postulieren gängige Theorien der CD4⁺ Treg-Aktivierung, dass DAMPs die CD4⁺ Tregs über einen indirekten TZR-vermittelten Mechanismus über die Präsentation auf APZ aktivieren (Stoecklein, Osuka et al. 2012, Li and Rudensky 2016). Konzepten der T-Zellaktivierung zufolge wird diese APZ-vermittelte T-Zell-Aktivierung durch die Interaktion des TZR der CD4⁺T-Zelle mit dem MHC-Antigenkomplexe der APZ ausgelöst (Mueller, Jenkins et al. 1989, Li and Rudensky 2016). Für die effektive T-Zellaktivierung ist zusätzlich zu dieser Interaktion ein zweites, kostimulatorisches Signal nötig (Mueller, Jenkins et al. 1989, Chen and Flies 2013).

Ein solches zweites Signal kann durch CD40L vermittelt werden, ein aktivierendes kostimulatorisches Molekül der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Grewal and Flavell 1996, Elgueta, Benson et al. 2009, Chen and Flies 2013). Sowohl Thrombozyten als auch CD4⁺ Tregs können über CD40L und dessen Rezeptor, CD40, interagieren. Das Ligand-Rezeptorpaar ist auf verschiedenen Zelltypen in Interaktionen involviert - so exprimieren T-Zellen CD40L und Thrombozyten CD40 (Henn, Steinbach et al. 2001, Kumanogoh, Wang et al. 2001, Schonbeck and Libby 2001, Inwald, McDowall et al. 2003, Martin, O'Sullivan et al. 2003, Danese, de la Motte et al. 2004, Guiducci, Valzasina et al. 2005, Spence and Green 2008, Martin, Agarwal et al. 2010, Li, Carlson et al. 2011). Auch auf dem regulatorischen CD4⁺ T-Zell Subtyp konnte eine CD40L-Expression nachgewiesen werden (Guiducci, Valzasina et al. 2005, Li, Carlson et al. 2011, Vogel, Verbinnen et al. 2013). Zusätzlich konnte in-vitro ein CD40L-abhängiger Interaktionsmechanismus von

T-Zellen und Thrombozyten beobachtet werden. So beobachteten Danese et al. erstmals, dass aktivierte T-Zellen Thrombozyten in-vitro über membrangebundenes CD40L aktivieren und Thrombozyten T-Zellen reziprok über diese Interaktion rekrutieren - eine Beobachtung die durch eine aktuelle Studie von Jin et al. bestätigt wurde (Danese, de la Motte et al. 2004, Jin, Xiao et al. 2018). In-vivo wurde die Interaktion von T-Zellen und Thrombozyten über eine CD40-CD40L-vermittelte Interaktion im murinen Leber-Ischämie-Reperfusion-Modell beobachtet (Khandoga, Hanschen et al. 2006). Auch für die Proliferation der CD4⁺ Tregs, welche u.a. über CD40L-CD40-medierte Interaktion mit dendritischen Zellen gesteuert wird, spielen CD40L-abhängige Aktivierungsmechanismen eine zentrale Rolle (Elgueta, Benson et al. 2009). Auf Basis dieser Vorstudien wurde in dieser Dissertationsarbeit CD40L auf eine potenzielle aktivierende kostimulatorische Rolle in der posttraumatischen Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten untersucht.

9.2.3.2 Neuer kostimulatorischer Aktivierungsmechanismus für CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über CD40L

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der posttraumatischen Funktion der CD4⁺ Tregs und Thrombozyten bei CD40L-Defizienz beobachtet (in 8.3). Die Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Lymphknoten und Milz ist bei CD40L-Defizienz posttraumatisch verringert und erreicht keine statistische Signifikanz. Vor dem Kontext der Studie von Bergmann und Koautoren, die ähnliche Veränderungen bei einer kompletten Depletion von Thrombozyten beobachteten (Bergmann, Hefele et al. 2016), wird basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Dissertationsarbeit konkludiert, dass die Signaltransduktion in der Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten zumindest teilweise CD40L-abhängig ist.

Diese Ergebnisse können molekular über verschiedene CD40L-abhängige Reaktionswege zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten nachvollzogen werden.

Über das intrinsische kostimulatorische Potenzial der CD40-CD40L-Interaktion, kann eine CD4⁺ Treg Aktivierung CD40L-abhängig durch kostimulatorische Signaltransduktion ausgelöst werden. So bewirkt die Bindung von CD40L und CD40 ein Clustering des CD40-Moleküls und führt zur Rekrutierung des intrazellulären TNF-Rezeptors assoziierten Faktors (TRAF) zu seiner zytoplasmatischen Domäne. Verschiedene TRAF-abhängige Signalkaskaden werden initiiert - diese MAPK, PLC γ , PI3K und und kanonischen und nicht-kanonischen nukleären Faktor NF κ B (Bishop, Moore et al. 2007). Alternativ kann eine CD40-CD40L-induzierte Signaltransduktion

TRAF-unabhängig über Janus-Kinase 3 (JAK3)-medierte STAT5-Phosphorylierung (engl. *Signal transducer and activator of transcription 5*, dt. Signalwandler und Aktivator der Transkription 5) ablaufen (Saemann, Kelemen et al. 2002, Saemann, Diakos et al. 2003). Zusammengenommen bewirken diese essentiellen Signale eine Zellaktivierung und führen zu Proliferation, Zytokinausschüttung und Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle (Elgueta, Benson et al. 2009).

Zusätzlich zu diesen Signalwegen gehen derzeitige Konzepte der T-Zellaktivierung davon aus, dass eine CD40L-abhängige T-Zellaktivierung zusätzlich über eine erweiterte Signaltransduktion vermittelt durch weitere kostimulatorische Moleküle induziert wird. Durch eine Bindung von T-Zell-exprimiertem CD40L an APZ-exprimiertes CD40 wird subsequent eine aktivierende Modulation des kostimulatorischen Moleküls B7 in intrazellulären Downstream-Signalprozessen induziert. B7 ist Interaktionspartner der kostimulatorischen Stimulation über CD28-B7, einem wichtigen Schritt der T-Zellaktivierung (Yang and Wilson 1996, Frauwirth and Thompson 2002, Kroczek, Mages et al. 2004). Dieses durch CD28-B7 hervorgerufene kostimulatorische Signal wirkt in der T-Zellaktivierung als zweites Signal neben der Stimulation des TZR durch Antigen präsentiert auf dem MHC-II-Komplex der APZ. Basierend auf diesen zwei Signalen werden drei Signaltransduktionskaskaden - NF- κ B, MAPK und Calcium-Calcineurin - aktiviert, die in einer Zellaktivierung resultieren (Snanoudj, Frangie et al. 2007). Prinzipiell ist dieser Aktivierungsmechanismus auch im Zusammenspiel von APZ und CD4⁺ Tregs unabhängig von Thrombozyten denkbar. Kürzlich wurde jedoch eine Rolle der Thrombozyten für die kostimulatorische T-Zellaktivierung postuliert. So zeigte eine murine Studie von Chapman und Mitarbeitern, dass bei adäquatem TZR-Stimulus über anti-CD3 eine in-vitro Inkubation von T-Zellen mit aktivierendem anti-CD28 im Effekt einer Inkubation mit Thrombozyten in der T-Zell-Aktivierung gleicht (Chapman, Aggrey et al. 2012). Zudem konnte in Studien von Semple et al. sowie Boshkov et al. gezeigt werden, dass Thrombozyten unter gewissen Voraussetzungen den, für APZ-Aktivität nötigen, DR-Isotyp des HLA-MHC-II-Rezeptors exprimieren können (Boshkov, Kelton et al. 1992, Semple, Milev et al. 1996). Humane Thrombozyten sind zudem in der Lage B7.2 (CD86) zu exprimieren, einen Ligand für das aktivierende CD28 (Chapman, Aggrey et al. 2012). Die essentielle Rolle dieser CD28-abhängigen Kostimulation für Entwicklung, Homöostase und Aktivierung der CD4⁺ Tregs ist in der Literatur gut belegt (Salomon, Lenschow et al. 2000, Tai, Cowan et al. 2005, Zhang, Huynh et al. 2013).

Zusammengenommen generieren die Ergebnisse somit im Kontext der Literatur die Hypothese, dass CD4⁺ Treg-Aktivierung über CD40L-vermittelte Kostimulation

stattfinden kann; schematisch dargestellt in Abbildung 27. Weitere mechanistische Studien zur Bestätigung des Konzepts sind nötig.

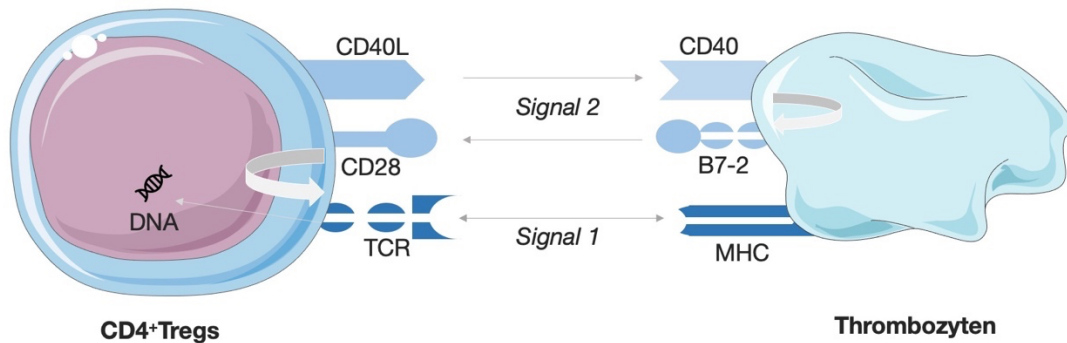


Abbildung 27 Schematisches Konzept einer CD40L-abhängigen kostimulatorischen CD4⁺ Treg-Aktivierung durch Thrombozyten in drei Schritten

Im ersten Schritt erfolgt eine TCR-Stimulation durch Antigen präsentiert auf den MHC-Molekülen (Boshkov, Kelton et al. 1992, Semple, Milev et al. 1996) exprimiert von Thrombozyten. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Kostimulation über den CD28-B7-Signalweg. Diese Schritte initiieren die Signaltransduktion über intrazelluläre NF- κ B-, MAPK- und Calcium-Calcineurin-Signalwege, welche in einer CD4⁺ Treg-Zellaktivierung resultieren. Dieses schematische Konzept ist angelehnt an das dreischrittige kostimulatorische T-Zell-Aktivierungskonzept (Snanoudj, Frangie et al. 2007).

Alternativ ist eine CD4⁺ Treg-Aktivierung thrombozytenabhängig über parakrine CD40L-abhängige Signalwege möglich. Eine in-vitro Studie von Danese et al. demonstrierte, dass CD40L-exprimierende T-Zellen Thrombozyten stimulieren und die Sezernation des thrombozytären Granulainhalts, reich an dem Chemokin RANTES, stimulieren können (Danese, de la Motte et al. 2004). RANTES wirkt chemotaktisch und über diesen Effekt konsekutiv eine CD4⁺T-Zellrekrutierung medierend. Resultierend kommt es über eine höhere CD4⁺T-Zellaktivität reziprok zu einer verstärkten CD4⁺T-Zell-abhängigen Thrombozytenaktivierung. In der Folge kommt es zu einer reziproken aktivierenden Feedbackschleife zwischen CD4⁺T-Zellen und Thrombozyten (Danese, de la Motte et al. 2004). Es ist bekannt, dass CD4⁺ Tregs über den Chemokinrezeptor CCR5 (C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5) verfügen, der RANTES (= CCL5, Chemokin-Ligand 5) binden kann, und so chemotaktisch die Migration der CD4⁺ Tregs im entzündeten Gewebe steuern kann (Chakraborty, Rooney et al. 2012). Zusätzlich zu TNFR2 und TRL4 (Bock, Bergmann et al. 2018) ergibt sich somit ein weiterer, CD40L-medierter parakriner Mechanismus für die Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten; schematisch dargestellt in Abbildung 28. Weitere Studien sind nötig, die die RANTES-abhängige Kommunikation - die für CD4⁺ foxp3-T-Effektorzellen und Thrombozyten

bewiesen ist - auch für $CD4^+$ Tregs und Thrombozyten untersuchen, bevor ein Konzept postuliert werden kann.

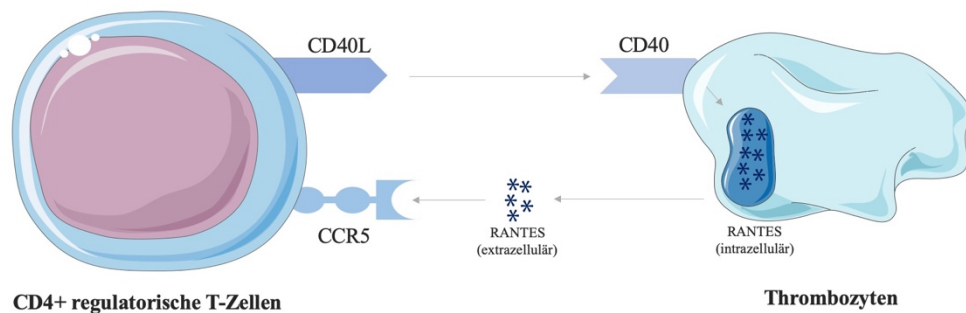


Abbildung 28 Parakrine CD40L-abhängige Interaktion von $CD4^+$ Tregs und Thrombozyten über RANTES

CD40L-exprimierende T-Zellen können Thrombozyten über CD40 stimulieren. Dies triggert die Sezernation des thrombozytären Granulinhalts, reich an dem Chemokin RANTES.

Während die Aktivierung der $CD4^+$ Tregs bei CD40L-Defizienz in dieser Studie sowohl in Lymphknoten als auch Milzgewebe gleichförmig gestört ist, unterscheiden sich die Parameter Baseline-Aktivität und posttraumatische Aktivität von den Ergebnissen bei Wildtyp-Tieren. Gemessen an der relativen Fluoreszenzintensität sind die Parameter Baseline-Aktivität und posttraumatische Aktivität beide erhöht bei CD40L-Defizienz (siehe 8.3.1). Auch bzgl. der Verteilung der $CD4^+$ Tregs zwischen LK und Milz können Unterschiede zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden. So sind in $CD40L^{KO}$ -Tieren mehr $CD4^+$ Tregs zentral in der Milz als im peripheren Kompartiment (Lymphknoten) lokalisiert und bei Trauma ändert sich das Verhältnis der $CD4^+$ Tregs zwischen Lymphknoten und Milz - im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren - nicht (siehe 8.3.1.3). Somit unterscheidet sich potentiell die Immunantwort bei CD40L-Defizienz von derjenigen in Wildtyp-Tieren. Der protektiv wirkende aktivierte $CD4^+$ Treg-Pool ist potentiell zentraler lokalisiert und bei Trauma findet keine dynamische Translokation der $CD4^+$ Tregs statt. Diese Ergebnisse deuten demnach auf potentielle CD40L-abhängige Unterschiede im Zirkulationsverhalten der $CD4^+$ Tregs hin. Im Hinblick auf das zirkulatorische Verhalten der $CD4^+$ Tregs ist bekannt, dass $CD4^+$ Tregs einer ähnlichen Zirkulation wie konventionelle $CD4^+$ T-Zellen zwischen Blut, Lymphknoten und extralymphatischen Gewebe unterliegen. So migrieren nicht-aktivierte $CD4^+$ Tregs über hochendotheliale Venolen in die T-Zellzone der Lymphknoten und werden durch Antigenpräsentation auf

APZ aktiviert (Wylie, Jones et al. 2016). Als aktivierte $CD4^+$ Tregs rezirkulieren sie in nicht-lymphatisches Gewebe für Restimulation und Proliferation oder Rezirkulation in Blut und Lymphe (Wylie, Jones et al. 2016). Die Ergebnisse aus 8.3.1.3, die auf ein verändertes zirkulatorisches Verhalten von $CD4^+$ Tregs bei CD40L-Defizienz hindeuten, müssen demnach im Kontext der vielfältigen Funktionen von CD40L in der Steuerung adhäsiver Mechanismen diskutiert werden. Über die Bindung an das Integrin MAC-1 kann CD40L als Adäsionsmolekül direkten Einfluss auf das Rollverhalten und die feste Adhäsion der Leukozyten ausüben (Wolf, Hohmann et al. 2011, Gerdes, Seijkens et al. 2016). Indirekt kann CD40L über CD40 die Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem Gefäßzelladhäsionsprotein 1 (engl. *vascular cell adhesion protein 1*, VCAM-1), ICAM-1 und E-Selektin auf Endothelzellen und Fibroblasten heraufregulieren (Schonbeck and Libby 2001). Des Weiteren kann CD40L über die Aktivierung von Thrombozyten via CD40 auf die Rekrutierung von Leukozyten Einfluss nehmen, indem deren Rollverhalten modifiziert wird und feste Adhäsion vermittelt wird (Wolf, Hohmann et al. 2011). Dies wurde von Wolf et al. postuliert, in deren Arbeit eine verminderte Bindungsfähigkeit von Leukozyten an Endothelzellen bei CD40L-Defizienz beobachtet wurde (Wolf, Hohmann et al. 2011). Da auch die CD40L-abhängigen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in der $CD4^+$ Treg-Biologie und Zirkulation eine wichtige Rolle spielen (Sakaguchi 2004, Nummer, Suri-Payer et al. 2007), kann die unterschiedliche lokalisationsbasierte Verteilung und daraufhin veränderte durchflusszytometrische Gesamtaktivität der $CD4^+$ Tregs nach Trauma bei CD40L-Defizienz potentiell in diesem Kontext interpretiert werden.

Zusammenfassend fügen sich die Erkenntnisse zur posttraumatischen Zellkontakt-abhängigen Aktivierung von $CD4^+$ Tregs über CD40L in die derzeitigen Konzepte der T-Zellaktivierung in der Literatur ein und generieren ein detaillierteres Verständnis des CD40L-CD40 Ligand-Rezeptor-Paares in der Interaktion zwischen $CD4^+$ Tregs und Thrombozyten nach Trauma.

9.2.3.3 *CD40L-abhängige Effektorfunktion der $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen*

Entscheidend für eine klinisch relevante Schlussfolgerung aus den Ergebnissen zu $CD4^+$ Treg-Aktivierung bei CD40L-Defizienz im traumatischen Setting ist ein Abschätzen der erhaltenen Effektorfunktion der $CD4^+$ Tregs bei CD40L-Defizienz.

Eine Beeinflussung der Effektorfunktion der CD4⁺ Tregs durch Blockade von CD40L wird derzeit intensiv erforscht. Die Studien in der Literatur, die die Beziehung CD40L und CD4⁺ Tregs untersuchen, unterscheiden sich in Modell und untersuchten Parametern und entbehren einer eindeutigen Aussage.

So zeigten Studien im Tiermodell, dass eine antikörperbasierte Blockade von CD40L einen Abfall der absoluten Zahl der CD4⁺ Tregs bewirkt (Li, Carlson et al. 2011); konsekutive Studien sowie diese Dissertationsarbeit konnten diese Ergebnisse auch für CD40L-Defizienz bestätigen (Guiducci, Valzasina et al. 2005, Seijkens, Engel et al. 2010). Guiducci und Koautoren beschrieben in einer in-vitro Studie mit murinen CD4⁺ Tregs, dass eine Blockade der CD40-CD40L-Interaktion keinen Einfluss auf die suppressive Aktivität der CD4⁺ Tregs hat und diese Funktion weiterhin erhalten ist (Guiducci, Valzasina et al. 2005). Im Kontext der potentiellen Rolle des CD28-B7 Signalwegs für die CD40L-abhängige CD4⁺ Treg-Aktivierung, ausgeführt in 9.2.3.2 (Yang and Wilson 1996, Frauwirth and Thompson 2002, Kroczeck, Mages et al. 2004) ist eine in-vitro Studie von Vogel und Mitarbeitern relevant, die zeigte, dass die suppressive Kapazität der CD4⁺ Tregs auch unter erweiterter antikörpervermittelter Kostimulationsblockade von CD40L-CD40 und B7-CD28 intakt bleibt (Vogel, Verbinnen et al. 2013). In derselben Studie konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die Effektorfunktion der CD4⁺ Tregs verglichen mit konventionellen CD4⁺T-Zellen nur zu einem geringeren Grad abhängig von einer CD40/CD28-abhängigen Kostimulation ist und CD4⁺ Tregs in Abwesenheit von CD40/CD28-abhängiger Kostimulation stärker proliferieren und funktionell dominant gegenüber den CD4⁺ foxp3-T-Effektorzellen sind (Vogel, Verbinnen et al. 2013). Dieser Effekt muss bei der Konzeption zunehmend translationaler Studien beachtet werden, die CD40-CD40L als Signalmoleküle involvieren - besonders vor dem Hintergrund einer posttraumatischen immunologischen Dysbalance zwischen überschießender Entzündung und Immunsuppression. Dass die antikörpervermittelten Blockade der CD4⁺ Tregs sogar mit einer erhöhten suppressiven Kapazität der CD4⁺ Tregs einhergeht, beschrieben Jarvinen und Koautoren basierend auf Daten erhoben in einem Transplantationsmodell (Jarvinen, Blazar et al. 2003). Zusammenfassend beschreibt das Gros der Literatur eine erhaltene regulatorische T-Zellfunktion trotz antikörpervermittelter Blockade von CD40-CD40L-Signalwegen.

9.2.3.4 Limitationen

Neben den in 9.1. diskutierten methodischen Limitationen wurde der Einfluss des gelösten CD40L (sCD40L) in dieser Studie nicht gesondert untersucht. sCD40L kann unabhängig vom direkten Zellkontakt über das membranständige CD40 eine Wirkung auf CD4⁺ Tregs ausüben kann, seine Wirkung kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse einer kompletten Depletion von Thrombozyten (Bergmann et al. (Bergmann, Hefele et al. 2016)) mit den Ergebnissen der CD40L-Defizienz dieser Dissertationsarbeit fällt jedoch eine ähnliche Veränderung der CD4⁺ Treg-Aktivierung nach Trauma auf. Auf dieser Basis kann eine Hypothese einer CD40L-vermittelten Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4⁺ Tregs über direkten Zellkontakt generiert werden kann.

Die Diskrepanz zwischen den Parametern der Baseline-Aktivität und posttraumatischen Aktivität der CD4⁺ Tregs bei CD40L-Defizienz ist im Rahmen dieser Studie nicht abschließend geklärt. Neben mechanistischen Gründen (siehe 9.2.3.2) sind methodische Gründe für das durchgehend höhere relative Fluoreszenzsignal in den gemessenen Parametern (Baseline-Aktivität, posttraumatische Aktivität) nicht auszuschließen. So kann die konstant niedrigere Zellularität der CD40L-defizienten Proben (siehe 8.1.1) bei gleichen Antikörpermengen einen Grund für die gemessenen Unterschiede darstellen. Die dynamische Messung der posttraumatischen Aktivierung, die in CD40L signifikant vermindert ist - die Hauptaussage dieser Arbeit - bleibt davon unbeeinflusst. Die heterogene Literatur zu CD4⁺ Treg-Aktivierung und Funktion bei CD40L-Defizienz oder CD40L-Blockade beachtend (siehe 9.2.3) sind subsequente Studien nötig, um die Rolle von CD40L in der CD4⁺ Treg-Biologie abschließend zu klären.

9.2.3.5 Schlussfolgerung: Konsequenz für das immunologische Gesamtverständnis von CD40L

CD40L spielt in der potentiell protektiven immunsuppressiven posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs eine Rolle. Während CD40L in der Literatur generell als proinflammatorisches Molekül angesehen wird (Stout and Suttles 1996, Zhang, Wu et al. 2013) vertieft das Verständnis der posttraumatischen Rolle von CD40L das Verständnis des Moleküls auch in seiner potentiellen Funktion in anti-inflammatorischen Prozessen.

9.2.4 Einfluss von CD40L auf die hämostatische Funktion der Thrombozyten

Nicht nur der immunologische Aspekt der posttraumatischen Interaktion durch CD40L, sondern auch die Affektion der posttraumatischen hämostatischen Funktion durch CD40L ist in dem Kontext der posttraumatischen Koagulationsstörungen von Interesse.

9.2.4.1 Der Einfluss von CD40-Ligand auf die posttraumatische Funktion der Thrombozyten

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals dynamische hämostatische Parameter mittels Rotationsthromboelastometrie bei CD40L-Defizienz. Es wurde gezeigt, dass die Einleitung der Hämostase (CT) bei CD40L-Defizienz im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verlängert ist (siehe 8.3.2). Zudem wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Gerinnelbildung (CFT & α -angle) bei CD40L-Defizienz im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verringert ist (siehe 8.3.2). Nach Trauma konnten bei CD40L-Defizienz im Vergleich zu Wildtyptieren keine signifikanten Änderungen der thromboelastometrischen Parameter beobachtet werden (siehe 8.3.2).

Diese Ergebnisse stützen das derzeitige Verständnis der hämatologischen Kompetenz von CD40L in der Literatur. So ist bereits untersucht, dass membrangebundenes CD40L4 nicht nur an der Aktivierung der immunologischen Thrombozyteneffektorfunktion beteiligt ist (Danese, de la Motte et al. 2004), sondern auch als Thrombozytenkoaktivator in der Kontrolle der hämostatischen Funktion der Thrombozyten fungiert (Horrillo, Fontela et al. 2014). Seine hämatologischen Funktionen kann CD40L über verschiedene Mechanismen ausüben. Auf direktem Weg kann CD40L durch Interaktion mit dem thrombogenen Glykoprotein GPIIb/IIIa verschiedene hämatologischen Veränderungen provozieren. Eine verstärkte Blutplättchenaggregation über einen CD40L-GPIIb/IIIa-abhängigen Mechanismus wurde erstmals von Prasad und Koautoren beschrieben (Prasad, Andre et al. 2003). In derselben Arbeit konnte über denselben Mechanismus eine CD40L-abhängige Induktion der Fibrinogenbindung beobachtet werden (Prasad, Andre et al. 2003). Eine Rolle der CD40L-GPIIb/IIIa-abhängigen Interaktion in der Stabilität der arteriellen Thromben wurde zusätzlich von Andre et al. postuliert (Andre, Prasad et al. 2002). Auch der Aktivierungszustand der Thrombozyten scheint direkt CD40L-abhängig reguliert zu werden. So konnten Horillo et al. in einer murinen CD40L-Knockoutstudie eine signifikant verringerte Aktivierung von Blutplättchen bei Stimulation mittels Thrombin beobachten (Horrillo, Fontela et al. 2014).

Auch durch indirekten Mechanismus kann CD40L die Hämostase über die Induktion von Gewebefaktor auf Monozyten aktivieren (Lindmark, Tenno et al. 2000, Aloui, Prigent et

al. 2014). Über diese Expressionsinduktion wird der Beginn der extrinsischen Gerinnungskaskade ausgelöst, was in einem prothrombotischen Effekt für den Organismus resultiert (Thomas and Storey 2015). Darüber hinaus führt die Bindung von GPIIb/IIIa - durch CD40L oder andere prokoagulatorische Mediatoren -reziprok zu einer erhöhten CD40L-Expression auf Thrombozyten. Dies resultiert im Verlauf in einer selbstaktivierenden Amplifikationsschleife für die Thrombozyten (May, Kalsch et al. 2002).

9.2.4.2 Limitationen

Obwohl CD40L-abhängige Veränderung der Hämostase zu beobachten sind, limitieren gewisse Faktoren Interpretation dieses Ergebnisses. Der Einfluss von CD4⁺ Tregs auf die hämostatische Funktion von Thrombozyten über einen CD40L-abhängigen Signalweg ist nur unter Einschränkungen zu beurteilen. Auch für andere Zelltypen des Organismus wie Endothelzellen oder immunologische Zelltypen wie CD4⁺Effektor-T-Zellen, B-Zellen und Monozyten ist eine C40L-abhängige Interaktion mit Thrombozyten beschrieben (Elgueta, Benson et al. 2009, Michel, Zirlik et al. 2017). Demnach lässt sich lediglich konkludieren, dass Thrombozyten über (das von CD4⁺ Tregs exprimierte) CD40L in ihrer hämostatischen Funktion beeinflusst werden - ein neuer Interaktionsmechanismus von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten lässt sich demnach nicht postulieren, sondern lediglich hypothesieren. Um den CD40L-abhängigen CD4⁺ Treg-Einfluss spezifisch zu testen, ist eine weitere Studie mit einem zusätzlichen Studienarm mit einer Depletion der CD4⁺ Treg notwendig. In diesem Studienarm könnte im Rahmen eines adoptiven Transfers eine Infusion von CD40L-defizienten CD4⁺ Tregs durchgeführt werden und jeweils vor und nach der Infusion eine rotationsthromboelastometrische Messung stattfinden, um den Einfluss der CD4⁺ Tregs auf die thrombozytäre Funktion bei CD40L-Defizienz genau zu analysieren.

9.2.4.3 Schlussfolgerung

Bei CD40L-Defizienz zeigen sich hypokoagulatorische Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter der Thrombusbildung. In der posttraumatischen Hämostase wurden jedoch keine signifikanten posttraumatischen Veränderungen festgestellt beobachtet. Die von Bergmann et al. (Bergmann, Hefele et al. 2016) beobachteten früh posttraumatischen Änderungen der hämostatischen Parameter, die bei Unterbrechung der CD4⁺ Treg-Thrombozyten-Wechselwirkung in Richtung

Hypokoagulation tendieren, sind demnach nicht auf einen CD40L-Mangel zurückzuführen zu sein. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten, dass CD4⁺ Tregs im traumatischen Kontext die hämostatische Kapazität der Thrombozyten über CD40L-vermittelte Signalwege beeinflussen. Die Analyse zeigt jedoch, dass CD40L-abhängige Signalwege an einer adäquaten Blutgerinnung des Organismus beteiligt sind, die für traumatisierte Patienten als protektiv angesehen wird.

9.2.5 Verminderte posttraumatische Aktivierung der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen bei P-Selektin Gendefizienz

9.2.5.1 Rolle von P-Selektin in der CD4⁺T-Zellaktivierung bei Inflammation

Einer der ersten Schritte in der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion ist die Rekrutierung von T-Zellen aus dem Blut in das entzündlich veränderte Gewebe. In diesem Rekrutierungsprozess spielt die Interaktion des Adhäsionsmoleküls P-Selektin mit seinem Liganden PSGL-1 eine wichtige Rolle (Carlow, Tra et al. 2018). Verschiedene Zelltypen speichern und exprimieren P-Selektin und PSGL-1. Thrombozytär wird P-Selektin insbesondere in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert und bei thrombozytärer Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert (Moore and Thompson 1992). Zusätzlich wird es auch auf dem Endothel exprimiert und durch diese Expression wird die Bindung an T-Zellen und andere Leukozyten vermittelt, die PSGL-1 konstitutiv exprimieren (Stenberg, McEver et al. 1985, Moore and Thompson 1992). Nach der initialen Bindung des thrombozytären P-Selektins an das leukozytäre PSGL-1 erfolgte durch subsequente Prozesse eine feste Zelladhäsion (Evangelista, Manarini et al. 1999). So binden weitere thrombozytäre Adhäsionsmoleküle wie das transmembranöse Glykoprotein ICAM-2 an leukozytäre Adhäsionsmoleküle wie das Integrin CD11a/CD18 (auch bezeichnet als Lymphozyten-funktionsassoziiertes Antigen 1, engl. *Lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1) (Evangelista, Manarini et al. 1999). Alternativ kommt es zu einer Bindung von thrombozytärem Transmembranprotein GPIb oder thrombozytärem Fibrinogen an das leukozytäre β -2-Integrin CD11b/CD18 (auch bezeichnet als Makrophagen-1 Antigen, engl. *Macrophage-1 antigen*, Mac-1) (Evangelista, Manarini et al. 1999). Diese P-Selektin-abhängigen Prozesse ermöglichen bei inflammatorischen Stimuli die Rekrutierung von CD4⁺ T-Zellen in reagierende Lymphknoten und andere entzündete Gewebe. Über diese Mechanismen wird bei einer Inflammation die effektive Rekrutierung von Immunzellen sicher gestellt (Martin-Fontecha, Baumjohann et al. 2008, Tinoco, Otero et al. 2017). Eine P-Selektin-abhängige

Interaktion von Thrombozyten und CD4⁺T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt konnte von Hanschen und Koautoren in einem murinen nicht-traumatischen Leber-Ischämie-Reperfusion-Modell beobachtet werden. Bei dieser Interaktion scheint P-Selektin für die Kolokalisation der CD4⁺ T-Zellen und Thrombozyten eine entscheidende Rolle zu spielen (Khandoga, Hanschen et al. 2006). Für die CD4⁺ Treg Population ist bekannt, dass P-Selektin auf diesem Zelltyp prominent exprimiert wird - verglichen mit CD4⁺ T-Effektorzellen ist die Expression auf CD4⁺ Tregs sogar erhöht (Kohm, Carpentier et al. 2002). Auf Basis dieser Vorstudien wurde P-Selektin in dieser Dissertationsarbeit auf eine potenzielle aktivierende Rolle in der posttraumatischen Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über direkten Zell-Zellkontakt untersucht.

9.2.5.2 Neuer Aktivierungsmechanismus für CD4⁺ regulatorischen T-Zellen über P-Selektin

In der vorliegenden Arbeit wurden in (siehe 8.4.1) Veränderungen in der posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs und Funktion der Thrombozyten bei P-Selektin Defizienz beobachtet.

Die Aktivierung von CD4⁺ Tregs in Lymphknoten und Milz ist bei P-Selektin Defizienz posttraumatisch verringert und erreicht keine statistische Signifikanz.

Vor dem Hintergrund der Pilotstudie von Bergmann et al., in der ähnliche Veränderungen beobachtet worden waren, wenn die Thrombozyten vollständig depletiert wurden (Bergmann, Hefele et al. 2016), kann hypothetisiert werden, dass die Signaltransduktion in der Interaktion zwischen CD4⁺ Treg und Thrombozyten zumindest teilweise P-Selektin-abhängig ist.

Auf molekularer Ebene gibt es verschiedene Möglichkeiten, eine Wechselwirkung von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über P-Selektin-abhängige Signaltransduktion zu erklären. Posttraumatisch werden Thrombozyten aktiviert, woraufhin sie degranulieren und P-Selektin als Zeichen der Aktivierung auf der Oberfläche exprimieren (Furie, Furie et al. 2001). Das oberflächenexponierte P-Selektin bindet an PSGL-1, das auf T-Zellen nach antigen- oder DAMP-gesteuerter Aktivierung exprimiert wird (Ley and Kansas 2004). Über verschiedene direkte und indirekte Downstream-Prozesse kann nun eine P-Selektin-assoziierte Zellaktivierung initiiert werden.

Auf direktem Weg spielen intrazelluläre Signale von PSGL-1 über das Adapterprotein Moesin potentiell eine Rolle bei der CD4⁺ Treg-Aktivierung. Serrador und Koautoren beobachteten mittels Fluoreszenz-Videomikroskopie, wie PSGL-1 nach Bindung von P-

Selektin mit dem Adapterprotein Moesin interagiert. Moesin spielt eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung und ist auch bei TZR-abhängigen Aktivierungsmechanismen in die Signalkette involviert, die letztendlich zur einer IL-2 abhängigen Zellaktivierung führt (Shaffer, Dupree et al. 2009). Über die Ezrin/Radixin/Moesin-Achse kommt es zu einer Aktivierung der Syk-Kinasen, welche in weiteren nachgeschalteten Signalwegen die Zellaktivierung regulieren (Serrador, Urzainqui et al. 2002, Urzainqui, Serrador et al. 2002, Andre 2004, Shaffer, Dupree et al. 2009).

Zudem existieren auch verschiedene indirekte P-Selektin-abhängige Zellaktivierungsmechanismen, konzeptuell dargestellt in Abbildung 29. So kann eine CD4⁺ Treg-Aktivierung P-Selektin-abhängig parakrin via RANTES erfolgen. Über die P-Selektin-vermittelte Kolokalisation kann RANTES, welches zeitgleich mit P-Selektin aus den Thrombozyten-Granula freigesetzt wird, in direkter räumlicher Nähe seine chemotaktischen zellaktivierenden Effekte ausüben (Andre 2004, Danese, de la Motte et al. 2004). Dieser Effekt kann über den Chemokinrezeptor CCR5 der CD4⁺ Tregs vermittelt werden, welcher in der Lage ist, RANTES zu binden (Chakraborty, Rooney et al. 2012). Auch weitere zellaktivierende parakrine Signalwege zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten, wie sie beispielsweise Bock et al. in einem murinen Verbrennungsmodell über TNF- α oder TLR4 beobachteten, können in der räumlichen Nähe basierend auf der P-Selektin-vermittelten Kolokalisation ihr volles Stimulationspotential entfalten (Bock, Bergmann et al. 2018).

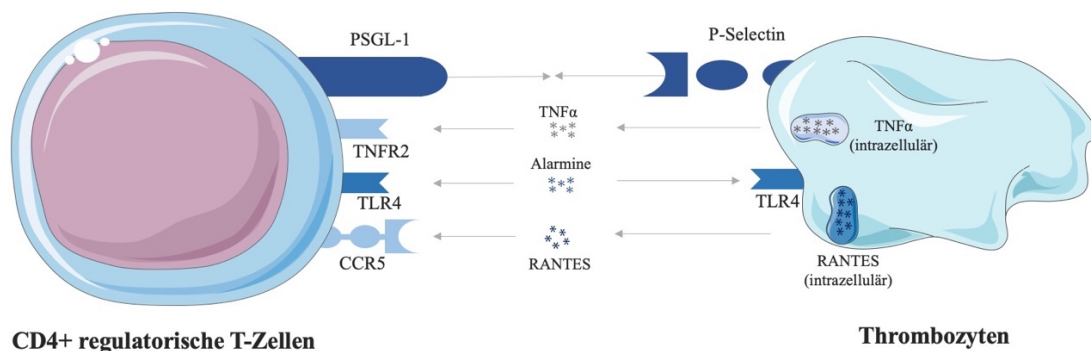


Abbildung 29 Parakrine P-Selektin-abhängige Interaktion von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten über TNF α /TNFR2, Alarmine und RANTES

Über P-Selektin und PSGL-1 kolokalisieren sich CD4⁺ Tregs und Thrombozyten. Durch die räumliche Nähe in dieser Kolokalisation können aktivierende parakrine Interaktionsmechanismen ihr volles Potential entwickeln. Im Aktivierungsprozess beteiligte Aktivatoren wie TNF α , Alarmine und Chemokine wie RANTES üben so ihren aktivierenden Effekt in der Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten aus.

Darüber hinaus kann eine potentielle Adhäsion von Thrombozyten und CD4⁺ Tregs die T-Zell-Aktivierungskapazität von kostimulatorischen Molekülen wie CD40L fördern, die eine Rolle bei der CD4⁺ Treg-Aktivierung spielen (siehe 9.2.3).

Durch die in dieser Arbeit beobachtete Funktion von P-Selektin in der frühen posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs wird das Verständnis von P-Selektin - klassischerweise als inflammatorisches Molekül verstanden - um eine Rolle in antiinflammatorischen Prozessen erweitert. Dieser entzündungshemmende Aspekt der P-Selektin-PSGL-1-abhängigen Signalwege wurde in der Literatur bereits im Rahmen von verschiedenen Modellen untersucht. So beobachteten Matsumoto und Koautoren in einer murinen Studie des adaptiven Immunsystems, dass PSGL-1 T-Zell-vermittelte Immunantworten negativ regulieren kann (Matsumoto, Miyasaka et al. 2009). Tinoco und Mitarbeiter diskutierten die Funktion von PSGL-1 als Immun-Checkpoint-Regulator, als sie beobachten, dass PSGL-1-Expression mit dem pro/antiinflammatorischen Mediatorprofil assoziiert ist (Tinoco, Carrette et al. 2016). So wurden bei einer PSGL-1-Defizienz erniedrigte Spiegel inhibitorischer Mediatoren für die CD4⁺T-Effektorzellen - wie z.B. PD-1 - gemessen, während erhöhte Spiegel von proinflammatorischem TNF α und Interferon- γ registriert wurden (Tinoco, Carrette et al. 2016). In zusätzlichen Studien wurde demonstriert, dass ein PSGL-1-Knockout einen entzündlichen immunologischen Phänotyp bedingt. Dieser entsteht durch ein Ungleichgewicht des adaptiven Immunsystems, im Speziellen einer Dysbalance zwischen regulatorischen Zellen und proinflammatorischen Effektorzellen (Perez-Frias, Gonzalez-Tajuelo et al. 2014, Abadier and Ley 2017). Diese Tatsache ist vor allem im Kontext der Arbeit von Kohm und Koautoren von Interesse, die dokumentiert, dass CD4⁺ Tregs im Vergleich zu nicht-regulatorischen T-Zellen signifikant erhöhte P-Selektin-Spiegel aufweisen (Kohm and Miller 2003). Zusammengenommen deutet dies auf eine Rolle von P-Selektin in der antiinflammatorischen CD4⁺ Treg-Biologie hin, die durch die Beobachtungen dieser Studie untermauert wird.

Die Aktivierung der CD4⁺ Tregs bei P-Selektin Defizienz ist - im Vergleich zu Wildtyptieren - sowohl in Lymphknoten als auch Milzgewebe gleichförmig gestört. Die Parameter Baseline-Aktivität und posttraumatische Aktivität bei P-Selektin Defizienz sind im Gegensatz zu Wildtyptieren vermindert - diese Tendenz ist zwischen Lymphknoten und Milz gleichförmig. Im Milzgewebe ist der Unterschied zwischen P-Selektin-defizienten Tieren und Wildtyptieren in den Parametern Baseline-Aktivität und posttraumatischer Aktivität jedoch schwächer ausgeprägt als im Lymphknotengewebe

(sowohl bzgl. der statistischen Signifikanzwerte als auch bzgl. der absoluten Werte). Im Hinblick auf die Verteilung des CD4⁺ Treg-Pools sind zentral in der Milz, verglichen mit peripheren Lymphknoten, mehr CD4⁺ Tregs als in Wildtyp-Tieren zu finden und bei Trauma ändert sich die Balance - im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren - nicht entscheidend. Hieraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich die Immunantwort bei P-Selektin Defizienz von derjenigen in Wildtyp-Tieren unterscheidet. Der protektiv wirkende aktivierte CD4⁺ Treg-Pool ist bei P-Selektin Defizienz potentiell zentraler lokalisiert als in Wildtyp-Tieren und bei Trauma findet sich keine dynamische Translokation der CD4⁺ Tregs statt. Diese Ergebnisse deuten demnach auf potentielle P-Selektin-abhängige Unterschiede im Zirkulationsverhalten der CD4⁺ Tregs hin.

Ursächlich hierfür könnte der in (siehe 9.2.3.2) beschriebene komplexe zirkulatorischen Kreislauf zwischen lymphatischen und extralymphatischen Gewebe sein, dem CD4⁺ Tregs unterliegen (Wylie, Jones et al. 2016). P-Selektin ist in seiner Interaktion mit PSGL-1 entscheidend für die Initiation der Extravasation aktivierter T-Zellen in entzündetes Gewebe (Mayadas, Johnson et al. 1993, Sackstein 2005). Es wurde in diesem zirkulatorischen Kontext für CD4⁺ Tregs auch eine Interaktion von P-Selektin und T-Zell-Immunglobulin Muzin 1 (TIM-1) nachgewiesen (Degauque, Mariat et al. 2008). Auch wenn diese Interaktion für die Rekrutierung von Th1- und Th17-Zellen im inflammatorischen Kontext stärker ausgeprägt ist als für CD4⁺ Tregs, kann dieser Mechanismus die veränderte Migration der CD4⁺ Tregs bei P-Selektin Defizienz potentiell erklären (Angiari, Donnarumma et al. 2014). Auf Basis dieser Studienlage kann die veränderte CD4⁺ Treg-Verteilung und alterierte durchflusszytometrisch gemessene Gesamtaktivität der CD4⁺ Tregs nach Trauma bei P-Selektin Defizienz potentiell in diesem Kontext interpretiert werden.

Die statistischen Effekte und absoluten Differenzen zwischen Wild-Typ und Knockout-Tieren sind bei CD40L-Defizienz stärker ausgeprägt als bei P-Selektin Defizienz. Diese Beobachtung kann potentiell in einer additiven Wirkung der Effekte beider Moleküle begründet sein. Darauf weist eine Arbeit von Danese und Koautoren hin, die einen reziproken Verstärkungseffekt der beiden Interaktionsmoleküle beobachtet. So wurde demonstriert, dass eine Aktivierung von Thrombozyten durch CD4⁺T-Zellen eine Degranulation von P-Selektin bedingt, welche reziprok eine CD4⁺T-Zell-Aktivierung triggert. Zusammengefasst kann dieser P-Selektin-abhängige Mechanismus zu einem

Synergismus mit den CD4⁺ Treg-aktivierenden Effekten durch CD40L-vermittelte Interaktion führen (Danese, de la Motte et al. 2004).

9.2.5.3 P-Selektin-abhängige Effektorfunktion der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen

Weiterhin relevant für potentiell klinische Schlussfolgerung aus den Ergebnissen zu CD4⁺ Treg-Aktivierung bei CD40L-Defizienz im traumatischen Setting ist ein Abschätzen der erhaltenen Effektorfunktion der CD4⁺ Tregs bei CD40L-Defizienz.

Die Rolle der P-Selektin-vermittelten Mechanismen ist - im Hinblick auf CD4⁺ Tregs - nicht auf die in dieser Arbeit beobachtete frühe CD4- Treg-Aktivierung beschränkt. So wird P-Selektin als Molekül für eine effektive CD4⁺ Treg-Entwicklung angesehen, wie in 9.2.5.3 beschrieben (Kohm and Miller 2003, Angiari, Rossi et al. 2013). Weiterhin konnte von Urzainqui et al. gezeigt werden, dass auch der Differenzierungsprozess der CD4⁺ Tregs P-Selektin/PSGL-1 vermittelt reguliert wird. So wurde beobachtet, dass die Differenzierung von naiven CD4⁺T-Lymphozyten zu CD4⁺ Tregs durch PSGL-1 reguliert wird (Urzainqui, Martinez del Hoyo et al. 2007). Kohm und Koautoren berichteten zudem 2002, dass P-Selektin signifikant höher auf CD4⁺ Tregs (identifiziert über CD4- und CD25-Positivität) als auf CD4⁺ nicht-regulatorischen Zellen (identifiziert über CD4-Positivität und CD25-Negativität) exprimiert ist, was auf eine potentielle Rolle des Adhäsionsmoleküls in der Effektorfunktion der CD4⁺ Tregs hindeutet (Kohm, Carpentier et al. 2002).

In einer subsequenten Studie 2003 beobachteten Kohm und Mitarbeiter in in-vitro Proliferations- und Zytokinassays P-Selektin-defizienter Mäuse, dass die Proliferation der nicht-regulatorischen CD4⁺T-Effektorzellen signifikant höher als bei Wildtyptieren ist (Kohm and Miller 2003). Zudem wurden bei P-Selektin Defizienz signifikant höhere Zytokinproduktion und -Expression von proinflammatorischen T-Zell-Aktivierungsmarkern (Interferon gamma, IL-1 β , TNF- α , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), IL-5, IL-6) gemessen als bei Wildtyptieren (Kohm and Miller 2003). Diese in-vitro Ergebnisse suggerieren eine Rolle von P-Selektin für die immunsupprimierende CD4⁺ Treg-Effektorfunktion.

Die in-vitro Ergebnisse divergieren von in-vivo Ergebnissen derselben Studie, in der trotz P-Selektin Defizienz eine erhaltene immunsuppressive Funktion der CD4⁺ Tregs bei beschrieben wurde. Die Autoren hypothetisieren, dass P-Selektin die CD4⁺ Treg-

Effektorfunktion nicht direkt, sondern mutmaßlich über CD4⁺ Tregselektion, -differenzierung und/oder -expansion beeinflusst (Kohm and Miller 2003).

Zusammenfassend wird in der Literatur eine Rolle von P-Selektin für die CD4⁺ Treg-Funktion postuliert; der Signalmechanismus von P-Selektin in der CD4⁺ Treg Effektorfunktion ist allerdings noch nicht eindeutig beschrieben.

9.2.5.4 Limitationen

Analog zu den Limitationen in der Bewertung der CD4⁺ Treg-Aktivierung bei CD40L-Defizienz sind sowohl methodische Limitationen (siehe 9.1) als auch Limitationen in der Interpretation der Daten gegeben.

Auch der Unterschied zwischen den Parametern Baseline-Aktivität und posttraumatischer Aktivität der CD4⁺ Tregs bei P-Selektin Defizienz ist im Rahmen dieser Studie nicht abschließend geklärt. Neben den in (siehe 9.2.5.2) ausgeführten mechanistischen Gründen sind methodische Gründe für das unterschiedliche Fluoreszenzsignal in den gemessenen Parametern (Baseline-Aktivität, posttraumatische Aktivität) nicht auszuschließen. So kann die über alle Proben hinweg konstant erhöhte Zellularität der P-Selektin-defizienten Proben (siehe 8.1.2) bei gleichen Antikörpermengen einen Grund für die gemessenen Unterschiede darstellen.

Zusätzlich kann auf Basis dieser Studie nicht final geklärt werden, ob sich CD4⁺ Tregs und Thrombozyten posttraumatisch über eine P-Selektin-vermittelte Adhäsion kolokalisieren. Um diese Fragestellung abschließend zu klären, sind weitere Studien nötig - ggf. mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie.

Inhaltlich kann zudem nicht final geklärt werden, ob P-Selektin mechanistisch ursächlich für die Aktivierung der CD4⁺ Tregs verantwortlich ist, oder ob P-Selektin lediglich über eine Kolokalisation von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten verstärkend auf andere Mechanismen wirkt. Auch im Bezug auf diesen Aspekt sind Studien nötig, um den genauen molekularen Wirkmechanismus von P-Selektin zu verstehen.

9.2.5.5 Schlussfolgerung: Konsequenz für das immunologische Gesamtverständnis von P-Selektin

P-Selektin spielt eine Rolle in der posttraumatischen, potentiell protektiven Aktivierung von CD4⁺ Tregs. Während P-Selektin in der Literatur klassischerweise als Adhäsionsmolekül im inflammatorischen Kontext gilt, erweitert diese Arbeit das

Verständnis des Moleküls in antiinflammatorischen Prozessen der posttraumatischen Aktivierung von CD4⁺ Tregs.

9.2.6 Einfluss P-Selektin-abhängiger Signalwege auf die hämostatische Funktion der Thrombozyten

9.2.6.1 Einfluss von P-Selektin auf die posttraumatische Funktion der Thrombozyten

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass hämostatische Parameter bei P-Selektin Defizienz früh nach Trauma verändert sind. So ist die maximale Gerinnungsfestigkeit verringert und die Gerinnungszeit tendiert zu einer Verlängerung. Signifikante posttraumatische Veränderungen konnten nicht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse spiegeln das aktuelle wissenschaftliche Verständnis von P-Selektin in seiner prokoagulatorischen Rolle bei der Blutstillung wider. In der Literatur wurde bereits in verschiedenen Studien die Rolle von P-Selektin in der Initiation der Blutgerinnung beobachtet. Ein richtungsweisende prothrombotische Funktion von P-Selektin wurde von Palabrica und Mitarbeitern beobachtet, die zeigten, dass P-Selektin vermittelt der Einbau von Fibrin und die Akkumulation von Leukozyten im Thrombus gesteuert wird (Palabrica, Lobb et al. 1992). Lindmark et al. konnten zeigen, dass auf Thrombozyten exponiertes P-Selektin die Expression von monozytischem Gewebefaktor induziert, dem Initiator des extrinsischen Signalwegs der Gerinnungskaskade (Lindmark, Tenno et al. 2000). Zudem wurde gezeigt, dass die pro-hämostatische, mikropartikelvermittelte Übertragung von leukozytärem Gewebefaktor auf Thrombozyten über einen P-Selektin-abhängigen Mechanismus erfolgt (Rauch, Bonderman et al. 2000). Kollektiv wirken sich diese P-Selektin-abhängigen Prozesse prokoagulatorisch auf die Hämostase aus, was sich letztendlich in der verlängerten Blutungszeit bei P-Selektin Defizienz widerspiegelt (Subramaniam, Frenette et al. 1996). Dass die Bildung eines Thrombus im Rahmen der Hämostase bei P-Selektin Defizienz gestört ist (Merten and Thiagarajan 2000, Smyth, Reis et al. 2001), spiegelt das Ergebnis einer verminderten maximalen Gerinnungsfestigkeit in der vorliegenden Dissertationsarbeit wider. Zudem berichtete die Gruppe um Montoro-Garcia et al. über den Einfluss von P-Selektin aus kleinen Plättchen-Mikropartikeln (sPMP) auf dynamische hämostatische Parameter in der Rotationsthromboelastometrie. Sie konnten zeigen, dass die Zugabe von P-Selektin-reichen sPMPs, sezerniert von aktivierten Thrombozyten, zu einer verkürzten Gerinnungszeit in einem *extem-s* ROTEM®-Test führt. Subsequente Antikörperblockade von P-Selektin normalisierte die Gerinnungszeit wieder (Montoro-Garcia, Shantsila et al. 2014). Diese Ergebnisse korrelieren mit den

Ergebnissen einer verlängerten Gerinnungszeit bei P-Selektin Defizienz in dieser Dissertationsarbeit.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse dieser Arbeit ein detaillierteres Verständnis der veränderten hämostatischen Grundfunktionen bei P-Selektin-Mangel liefern. Die von Bergmann et al. (Bergmann, Hefele et al. 2016) beobachteten Änderungen der frühen posttraumatischen hämostatischen Parameter bei einer Unterbrechung der CD4⁺ Treg-Thrombozyten-Wechselwirkung sind - basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit - jedoch nicht auf den P-Selektin-Mangel zurückzuführen.

9.2.6.2 Limitationen

Eine direkter Interaktionsmechanismus zwischen Thrombozyten und CD4⁺ Tregs lässt sich basierend auf den Ergebnissen nicht postulieren. Die die thrombozytäre Funktion beeinflussende P-Selektin-abhängige Interaktion kann auch über andere, P-Selektin-exprimierende Zelltypen wie Endothelzellen vermittelt werden (Kutlar and Embury 2014). Zusätzlich können die Änderungen der hämostatischen Funktionen bei P-Selektin Defizienz auch rein thrombozytär bedingt sein und somit unabhängig von CD4⁺ Tregs. Zudem wurde lediglich die frühe posttraumatische Funktion der Thrombozyten untersucht. Relevante Änderungen in Hämostase spät nach Trauma wurden in dieser Arbeit nicht adressiert. In einer Pilotstudie von Bergmann und Koautoren konnte jedoch keine späten (7 Tage) posttraumatischen Veränderungen der Hämostase bei CD4⁺ Treg-Depletion beobachtet werden (Bergmann, Hefele et al. 2016), weswegen mutmaßlich keine P-Selektin-vermittelte Interaktion zwischen den beiden Zelltypen spät nach Trauma stattfindet.

9.2.6.3 Schlussfolgerung

Bei P-Selektin Defizienz zeigen sich hypokoagulatorische Veränderungen der Gerinnungszeit und maximalen Gerinnselfestigkeit in der Rotationsthromboelastometrie. In der posttraumatischen Hämostase wurden jedoch keine signifikanten posttraumatischen Veränderungen festgestellt beobachtet. Die von Bergmann et al. (Bergmann, Hefele et al. 2016) beobachteten Änderungen der hämostatischen Parameter früh nach Trauma, die bei Unterbrechung der CD4⁺ Treg-Thrombozyten-Wechselwirkung in Richtung Hypokoagulation tendieren, sind demnach nicht auf einen P-Selektin-Mangel zurückzuführen zu sein. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten, dass CD4⁺ Tregs die hämostatische Funktion der Thrombozyten im

traumatischen Kontext über P-Selektin-vermittelte Signalwege beeinflussen. Die Analyse zeigt sich jedoch, dass P-Selektin-abhängige Signalwege an einer adäquaten Blutgerinnung des Organismus beteiligt sind, die für traumatisierte Patienten als protektiv angesehen wird.

9.2.7 Der klinische Ausblick

Auf der Basis der in dieser Dissertation postulierten Rolle von CD40L und P-Selektin in der posttraumatischen Immunreaktion der CD4⁺ Tregs und Thrombozyten kann die Durchführung subsequenter interventioneller Studien diskutiert werden.

Bei der Konzeption translationaler Studienprotokolle sind therapeutisch intendierte Eingriffe in den CD40-CD40L Signalweg jedoch kritisch bzgl. der Nebenwirkungen zu diskutieren. Sowohl im Hinblick auf die immunologischen als auch hämostatischen Kapazitäten des Signalwegs führen Modifikationen zu komplexen Konsequenzen. Eine Supplementation von CD40L oder entsprechenden Agonisten zur Förderung der prinzipiell immunsuppressiv wirksamen CD4⁺ Treg-Aktivierung erscheint aufgrund des gleichzeitigen massiven proinflammatorischen Potentials des Moleküls in traumatischem Kontext nicht sinnvoll (Stout and Suttles 1996, Zhang, Wu et al. 2013). Dies zeigt sich unter anderem dadurch, dass die lösliche Form von CD40L - sCD40L - in der Interpretation einer observierenden humanen Studie als prädiktiver proinflammatorischer Marker für Morbidität und Mortalität nach Trauma angesehen wird (Johansson, Sorensen et al. 2012).

Bei der Untersuchung des Signalwegs im Kontext maligner Pathologien wird die komplexe ambivalente Rolle des Moleküls deutlich. CD40L-antagonistisch konnte der Signalweg im Tumorsetting eingesetzt werden; mit dem Einsatz von monoklonalen anti-CD40 Antikörpern im murinen Lymphommodell konnte eine lang anhaltende T-Zell-Immunität gegen den Tumor mit kompletter Remission erzielt werden (Tutt, O'Brien et al. 2002). Agonistisch wurde der CD40/CD40L Signalweg in einer interventionellen Studie zum Magenkarzinom genutzt, in der sCD40L zytostatische und proapoptische Effekte erzielen konnte (Li, Chen et al. 2011).

Antagonistische Effekte zum CD40/CD40L Signalweg mittels monoklonalen anti-CD40L-Antikörper wurde im Tiermodell auch erfolgreich in der Transplantationsforschung zur Verbesserung der transplantationsbedingten Vaskulopathie eingesetzt (Wang, Morelli et al. 2003).

Allerdings müssen im Kontext immunomodulatorischer Interventionen die hämostatischen Konsequenzen diskutiert werden. So ist aus einer interventionellen

humanen Studie von Boumpas et al. bekannt, dass BG9588 - ein humanisierter anti-humaner CD40L-Antikörper - eine erhöhte Rate an thromboembolischen Events mit zwei Fällen von Myokardinfarkten provozierte (Boumpas, Furie et al. 2003). Auch in einer Studie an Affen mit dem anti-CD40L Klon ATTC 5C8.33 wurde multiple thrombotische Ereignisse beobachtet (Kawai, Andrews et al. 2000). Diese hämostatischen Nebenwirkungen unterstreichen das hämatologische Potential des Moleküls und eine klare Risiko- und Nutzenabschätzung ist vor dem Einsatz des Moleküls in translationalen Studien im posttraumatischen Kontext notwendig. Weitere Studien hierzu, die die genauen pathologiebezogenen Mechanismen des Moleküls sowie Gesamtverträglichkeit einer Modulation des CD40/CD40L-Systems für das Immunsystem untersuchen, sind dringend notwendig.

Auch P-Selektin wurde und wird in der Literatur als Ziel medikamentöser Interventionen diskutiert. Bzgl. der hämostatischen Funktionen des Moleküls wurde die P-Selektin-PSGL-1 Wechselwirkung bereits in verschiedenen Tiermodellen antagonistisch adressiert. Die Verwendung eines rekombinanten löslichen PSGL1-Immunglobulins im Tiermodell resultierte in einer verbesserten arteriellen Thrombolysen (Kumar, Villani et al. 1999). Auch venös konnten positive Effekte erzielt werden; eine Anwendung des rekombinanten löslichen PSGL1-Immunglobulins in einem Tiermodell venöser Thrombosen verbesserte die Fibrinolyse (Myers, Wroblewski et al. 2002). Immunologische Komplikationen, bedingt durch eine verschlechterte proinflammatorische Funktion des Immunsystems, als Nebenwirkung einer kompetitiven Hemmung von P-Selektin durch rekombinantes lösliches PSGL1-Ig, scheinen zumindest im Setting systemischer Infektion nicht aufzutreten (Opal, Sypek et al. 2001). Autoren propagieren P-Selektin-abhängige Interventionsversuche als sicher und effektiv (Kumar, Villani et al. 1999, Myers, Wroblewski et al. 2002).

Agonistisch wurden die prothrombotischen Fähigkeiten des Moleküls bereits erfolgreich gegen antikoagulatorisches Schlangengift eingesetzt (Sun, Ho et al. 2016). Auch immunologische Studien interferieren mit der P-Selektin/PSGL-1-Achse. So wurde im Kontext T-zell-vermittelter inflammatorischer Erkrankungen 2005 beispielsweise eine antikörpervermittelte Blockade von PSGL-1 untersucht, welche sich apoptoseinduzierend auf aktivierte T-Zellen auswirkte (Huang, Lu et al. 2005). Weitere antikörpervermittelte Ansätze wurden erfolgreich im Tiermodell an weiteren inflammatorischen Pathologien (entzündlichen Darmerkrankungen, Pankreatitis, etc.), in der Ischämie/Reperfusion, in der Transplantationsmedizin sowie an T-zell-vermittelten, malignen, infektiösen, neurologischen, vaskulären und hepatischen klinischen

Applikationsfeldern getestet - eine Zusammenfassung hierzu wurde 2016 von Patel et al. im Rahmen einer Übersichtsarbeit publiziert (Patel, Miranda-Nieves et al. 2017).

Es wurde auch mit rekombinanten Strategien im Rahmen von immunologischen Studien gearbeitet, z.B. mit rekombinanten anti-PSGL-1 Antikörpern zur kompetitiven Hemmung des Einflusses von P-Selektin. Vergleichbar zu den antikörperbasierten Interventionsversuchen wurden auch die rekombinanten Strategien in Tierstudien in der Transplantationsmedizin, in Ischämie-Reperfusion-Modellen verschiedener Organe sowie in inflammatorischen und vaskulären Pathologien erfolgreich getestet (Patel, Miranda-Nieves et al. 2017). Auf Basis der überzeugenden Daten aus den Tierversuchen wurden diese rekombinanten Strategien auch in humanen klinischen Studien in der Transplantationsmedizin (Busuttil, Lipshutz et al. 2011, Gaber, Mulgaonkar et al. 2011) und bei Myokardinfarkten (Mertens, Maes et al. 2006) eingesetzt. Sie konnten jedoch keinen ausreichenden klinischen Nutzen unter Beweis stellen und wurden beendet (Mertens, Maes et al. 2006, Busuttil, Lipshutz et al. 2011, Gaber, Mulgaonkar et al. 2011). Auch therapeutische Interventionsversuche mit Glykomimetika gegen das Glykokonjugat PSGL-1 mit dem Ziel der Beeinflussung der P-Selektin-PSGL-1 Achse wurden konzipiert und konnten in klinischer Translation bei Psoriasis und COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, chronische obstruktive Lungenerkrankung) erfolgsversprechend angewendet werden (Friedrich, Bock et al. 2006, Watz, Bock et al. 2013). Auf der Suche nach krebs-therapeutischen Agenzien konnten Glycosyltransferase-Inhibitoren mit dem Ziel der Blockade notwendiger Konjugationsschritte der P-Selektin-PSGL-1-Interaktion in vitro und in vivo ersten Erfolge zeigen (Rillahan, Antonopoulos et al. 2012, Bull, Boltje et al. 2013), sind jedoch mit bedeutenden Nebenwirkungen assoziiert (Galeano, Klootwijk et al. 2007). Anti P-Selektin-Aptmere - einzelkettige Oligonukleotide mit Bindungsaffinität für P-Selektin - wurden im Tiermodell in vaskulären Erkrankungen therapeutisch eingesetzt (Diaz, Wroblewski et al. 2015), aufgrund von Nebenwirkungen durch Kreuzreaktivität jedoch nicht in humane Studien zugelassen (Lakhin, Tarantula et al. 2013). Neueste Interventionsversuche imitieren die Struktur von PSGL-1 mittels dem Glykopeptid-Analogen GSnP-6 mit dem Ziel der Inhibition von P-Selektin im Rahmen des metabolischen Syndroms (Patel, Miranda-Nieves et al. 2017). Trotz erster vielversprechender Ergebnisse stehen klinische Versuche zu diesem Agens noch aus (Patel, Miranda-Nieves et al. 2017).

Diese Literatur bietet eine Übersicht, in welchem Rahmen und mit welchen Strategien zukünftig auch die posttraumatische Immundysregulation adressiert werden könnte. Priorität sollte primär allerdings mechanistische in-vitro und in-vivo Studie eingeräumt

werden, die die genauen, über CD40L und P-Selektin hinausgehenden, Mechanismen der posttraumatischen Immundysregulation aufarbeiten. Erst auf Basis einer umfassenden Übersicht der Interaktionsmechanismen kann ein interventionelles Studienprotokoll nach Analyse der Effektstärken der verschiedenen Interaktionsmoleküle gewinnbringend eingesetzt werden.

10 Schlussfolgerung

Im Rahmen eines Polytraumas kann der Organismus immunologisch dysregulieren, was im Phänotyp einer systemischen Inflammation mit negativen Konsequenzen für den Patienten einhergeht (Lenz, Franklin et al. 2007, Stoecklein, Osuka et al. 2012). Aktuellste Literatur postuliert im immunologischen Bereich eine potentiell protektive reziproken Aktivierung von CD4⁺ Tregs und Thrombozyten nach Trauma (Bergmann, Hefele et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der direkte Zell-Zellkontakt als Mechanismus einer Interaktion zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten früh nach einem Trauma untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Moleküle des direkten Zell-Zellkontakts, CD40L und P-Selektin, eine Funktion in dieser Interaktion wahrnehmen.

Obwohl die Dysregulation des Immunsystems ein relevantes klinisches Problem in der Behandlung polytraumatisierter Patienten darstellt, sind die derzeitigen Konzepte der immunologischen Überwachung und Intervention nach wie vor unzureichend. Zum aktuellen Zeitpunkt ist das mechanistische Verständnis der posttraumatischen immunologischen Prozesse noch nicht ausgereift genug, um konkrete, klinische wertvolle Steuerungselemente oder Handlungsempfehlungen zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift liefern in diesem Kontext neue Erkenntnisse zu den zellkontakt-abhängigen Mechanismen potenziell protektiver posttraumatischer immunologischer Prozesse. Die durchgeführte mechanistische Untersuchung von CD40L- und P-Selektin-abhängigen Signalwegen - die bereits für andere Indikationen als therapeutische Ziele evaluiert wurden - sind die grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung überwachpharmakologischer immunmodulatorischer Strategien.

Im Hinblick auf die breiten immunologischen und hämostaseologischen Wechselwirkungen beinhalten weitere wissenschaftliche Schritte, zuerst eine komprehensive Analyse aller im Rahmen des Dachprojektes dieser Dissertationsarbeit untersuchten Mechanismen. So sollten die untersuchten parakrinen, zellkontakt-abhängigen, thrombozytenaggregations-abhängigen und thrombinabhängigen Signalwege in einem nächsten Schritt einer Bewertung der Stärke des Effekts ihrer Unterbrechung unterzogen werden. Von Vorteil für diesen Schritt kann sich auswirken, dass alle Experimente mit dem in der Pilotstudie etablierten experimentellen Protokoll durchgeführt wurden. Auf diese Weise können Sie der oder die vielversprechendsten Mechanismen identifiziert und im Rahmen weiterer, zunehmend klinisch orientierter Studien weiterverfolgt werden.

11 Zusammenfassung

Einleitung: Traumatische Verletzungen zählen mit weltweit zu den bedeutendsten Problemen der öffentlichen Gesundheit. Der in Rahmen dieser Verletzungen erlittene traumatisch bedingte Gewebeschaden führt durch überschießende pro- und antiinflammatorischen Einflüsse zu einer posttraumatischen Dysregulation des Immunsystems. $CD4^+$ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen ($CD4^+$ Tregs) gelten als wichtige Zellen der als protektiv angesehenen posttraumatischen antiinflammatorischen Reaktion des Organismus. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass Thrombozyten in der Lage sind, die $CD4^+$ Treg-Aktivität nach einer Verletzung zu modulieren. Die zugrunde liegenden Mechanismen der posttraumatischen Interaktion zwischen Thrombozyten und $CD4^+$ Tregs sind bis dato nicht final erforscht. In dieser Dissertationsschrift wurde untersucht, ob eine Interaktion von Thrombozyten und $CD4^+$ Tregs über Moleküle des direkten Zellkontakt stattfinden kann; es wurden das kostimulatorische Molekül CD40-Ligand (CD40L) und das Adhäsionsmolekül P-Selektin als potenzielle Kandidaten untersucht.

Fragestellung und Hypothesen: Vorbereitend wurde untersucht, ob ein Trauma im verwendeten Modell eine frühe posttraumatische Aktivierung von $CD4^+$ Tregs im Wildtyp-Organismus evoziert und zusätzlich wurde die Validität des Studiendesigns für die Gendefizienzen der zu untersuchenden Moleküle des direkten Zellkontakts verifiziert; es wurde hypothetisiert, dass das Studiendesign für die zu untersuchende Fragestellung valide ist. Im Rahmen der primären Fragestellungen wurde erforscht, ob CD40L- oder P-Selektin-abhängige Signalwege die frühe posttraumatische Aktivierung der $CD4^+$ Tregs beeinflussen; es wurde hypothetisiert, dass die frühe posttraumatische Aktivierung der $CD4^+$ Tregs durch CD40L oder P-Selektin beeinflusst wird. Im Rahmen der Sekundärhypothesen wurde erforscht, ob über CD40L und P-Selektin auch die posttraumatischen hämostatischen Fähigkeiten der Thrombozyten beeinflusst werden; es wurde hypothetisiert, dass die posttraumatische thrombozytäre Hämostase durch CD40L und P-Selektin beeinflusst wird.

Material und Methoden: Die Hypothesen wurden in einem murinen Verbrennungsverletzungsmodell unter Verwendung Wildtyptieren und gendefizienten Tieren (sechs Wochen alt, männlich, C57Bl/6N-Hintergrund, n=5-8) adressiert. In den Versuchsgruppen wurden Tiere mit CD40L- und P-Selectin-Gendefizienz eingesetzt, eine Kontrollgruppe wurde durch den Einsatz von Wildtyptieren etabliert. Die Versuchstiere wurden entweder durch traumatische Intervention durch Verbrennung dritten Grades von

25% der Körperoberfläche oder durch Scheinintervention behandelt. Drainierende Lymphknoten und Milzgewebe wurden eine Stunde nach drittgradiger Verbrennung oder Scheinintervention explantiert. Die Aktivierung der CD4⁺ Tregs wurde mittels Phosphodurchflusszytometrie über die Signalmoleküle (p)PKC- θ und (p)ZAP-70 bewertet. Die thrombozytäre Funktion wurde mittels Rotationsthromboelastometrie (ROTEM®) analysiert.

Ergebnisse:

Im Rahmen der Experimente wurde phosphodurchflusszytometrisch gezeigt, dass ein Verbrennungstrauma – im Gegensatz zu einer Scheinintervention - eine signifikante Aktivierung von CD4⁺ Tregs bei Wildtyp-Mäusen nach einer Stunde in allen untersuchten Geweben induziert. Bei CD40L-Defizienz zeigte sich sowohl eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl als auch der CD4⁺Treg Population. Bei P-Selektin-Defizienz zeigte sich sowohl eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl als auch der CD4⁺Treg-Population. Bei jeweils erhaltenen CD4⁺ Treg Zellpopulationen konnte das Modell somit für die jeweiligen Gendefizienzen validiert werden.

In dieser Dissertationsschrift konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der CD40L-Interaktionen in einer signifikant verringerten posttraumatischen Aktivierung der CD4⁺ Tregs im Vergleich zum Wildtyp resultiert. Zudem wurde im Vergleich zum Wildtyp phosphodurchflusszytometrisch eine niedrigere lymphatische sowie höhere splenische CD4⁺ Treg-Aktivität sowie ein – im immunologischen Gleichgewicht - splenisch orientierter Shift in der Verteilung des reagiblen CD4⁺ Treg Pools beobachtet.

In einem weiteren Abschnitt dieser Studie wurde erstmals gezeigt, dass eine Disruption der P-Selektin-abhängigen Interaktionen posttraumatisch in einer signifikant verringerten Aktivierung der CD4⁺ Tregs im Vergleich zu Wildtyptieren resultiert. In den phosphodurchflusszytometrischen Untersuchungen wurde zudem, im Vergleich zum Wildtyp, posttraumatisch eine niedrigere lymphatische CD4⁺ Treg-Aktivität sowie eine - in Homöostase - relative Translokation des reagiblen CD4⁺ Treg Pools in das Milzgewebe gemessen.

Interessanterweise wurden bei Gendefizienzen von CD40L und P-Selectin jeweils hypokoagulatorische Veränderungen der rotationsthromboelastometrischen Parameter beobachtet, die posttraumatische Hämostase bei Gendefizienz unterlag jedoch keinen signifikanten posttraumatischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp.

Diskussion: Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit nahe, dass die posttraumatische Wechselwirkung zwischen CD4⁺ Tregs und Thrombozyten

zumindest teilweise über direkte Zell-Zell-Signalübertragung via CD40L und P-Selektin vermittelt wird. Diese Dissertationsschrift liefert in diesem Kontext neue Erkenntnisse zu den zellkontakt-abhängigen Mechanismen potenziell protektiver posttraumatischer immunologischer Prozesse. Zudem ergibt sich durch die Ergebnisse ein erweitertes Verständnis der komplexen immunologischen und hämostaseologischen Funktionen der Moleküle CD40L und P-Selektin im traumatischen Kontext.

Abstract

Introduction: Traumatic injuries continue to represent one of the leading causes of death worldwide. The immunological response mechanisms to trauma are complex. It was demonstrated that CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells (CD4⁺ Tregs) play a key role in the protective anti-inflammatory immune response after trauma. Recent studies have shown that platelets stimulate the activity of CD4⁺ Tregs early after trauma. The mechanisms of the interaction of platelets and CD4⁺ Tregs have not yet been investigated. The overarching research question of this dissertation was whether an interaction of platelets and CD4⁺ Tregs can take place via molecules of direct cell contact; the costimulatory molecule CD40 ligand (CD40L) and the adhesion molecule P-selectin were selected as potential candidates.

Research questions and hypotheses: First, it was investigated whether a trauma in the burn injury model used evokes an early post-traumatic activation of CD4⁺ Tregs in the wild-type organism. Second, the validity of the study design based on gene deficiencies was tested for the molecules of direct cell contact to be examined; it was hypothesized that the study design would be valid for this purpose; it was hypothesized that the early post-traumatic activation of CD4⁺ Tregs would be influenced by CD40L or P-selectin. As primary hypotheses, it was investigated whether CD40L- or P-selectin-dependent signaling pathways influence the early post-traumatic activation of CD4⁺ Tregs. As secondary hypotheses, it was investigated whether these molecules also influence the post-traumatic hemostatic abilities of the platelets; it was hypothesized that the post-traumatic platelet-mediated hemostasis would be influenced by CD40L and P-selectin..

Material and methods: The research questions were addressed in a murine burn injury model on male mice with a C57BL / 6N background. The signaling pathways were selectively addressed by gene knockout; CD40L gene deficient animals and P-selectin gene deficient animals were employed in the experimental groups and wild-type mice were selected for the control group. The mice were treated either by traumatic intervention via third-degree burn of ~ 25% of the body surface or by sham intervention. The draining lymph nodes and spleen tissue were harvested one hour after trauma. In a first step, the knock-out model for the investigation of the CD4⁺ Treg function in the respective gene deficits was validated. In a further step, the activation and phosphorylation of intracellular signaling molecules in CD4⁺ Tregs (ZAP-70, pZAP-70, PKC-theta, pPKC-theta) were analyzed by phospho-flow cytometry. Finally, platelet function was analyzed using rotational thromboelastometry (ROTEM®).

Results: Phosphoflow cytometry showed that trauma - in contrast to a sham intervention - induces a significant activation of CD4 + Tregs in wild-type mice after one hour in all examined tissues.

In the case of CD40L deficiency, both the total cell number and the CD4 + Treg population were significantly reduced. In the case of P-selectin deficiency, there was a significant increase in both the total number of cells and the CD4 + Treg population. Thus, as persistent CD4 + Treg cell populations could be measured despite gene deficiency, the model could be validated for the respective gene deficiencies.

This dissertation was able to show for the first time that an interruption of the CD40L interactions results in a significantly reduced post-traumatic activation of the CD4 + Tregs compared to the wild type. In addition, a lower lymphatic and higher splenic CD4 + Treg activity as well as a splenically oriented shift in the distribution of the responsive CD4 + Treg pool - in the immunological equilibrium - was observed in comparison to the wild-type.

Furthermore it was shown for the first time, that a disruption of the P-selectin-dependent interactions posttraumatically results in a significantly reduced activation of CD4 + Tregs compared to wild-type animals. Via phospho-flowcytometry, a lower posttraumatic lymphatic CD4 + Treg activity and a - in homeostasis - relative translocation of the responsive CD4 + Treg pool into the splenic tissue were measured compared to the wild type. Interestingly, in the case of gene deficiencies of CD40L and P-selectin, hypocoagulatory changes in the rotational thromboelastometric parameters were observed, while posttraumatic hemostasis was not subject to significant post-traumatic changes.

Discussion: It was shown that CD40L- and P-selectin-mediated interactions are potentially important signals in the posttraumatic interaction of CD4 + Tregs after trauma. Changes in the post-traumatic activation of CD4⁺ Tregs and the platelet function when these signaling pathways were interrupted were observed. This potentially indicates that CD40L and P-selectin with their associated signal pathways play an important role in post-traumatic immunological function. The results generate additional evidence in understanding the clinically relevant immunological dysregulation after trauma.

12 Literaturverzeichnis

1. Abadier, M. and K. Ley (2017). "P-selectin glycoprotein ligand-1 in T cells." *Curr Opin Hematol* 24(3): 265-273.
2. Abbas, A. K., C. Benoist, J. A. Bluestone, D. J. Campbell, S. Ghosh, S. Hori, S. Jiang, V. K. Kuchroo, D. Mathis, M. G. Roncarolo, A. Rudensky, S. Sakaguchi, E. M. Shevach, D. A. Vignali and S. F. Ziegler (2013). "Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature." *Nat Immunol* 14(4): 307-308.
3. Abdullahi, A., S. Amini-Nik and M. G. Jeschke (2014). "Animal models in burn research." *Cell Mol Life Sci* 71(17): 3241-3255.
4. Acosta, J. A., J. C. Yang, R. J. Winchell, R. K. Simons, D. A. Fortlage, P. Hollingsworth-Fridlund and D. B. Hoyt (1998). "Lethal injuries and time to death in a level I trauma center." *J Am Coll Surg* 186(5): 528-533.
5. Adib-Conquy, M. and J.-M. Cavaillon (2008). "Compensatory anti-inflammatory response syndrome." *Thrombosis and Haemostasis*.
6. Agace, W. W. and K. D. McCoy (2017). "Regionalized Development and Maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape." *Immunity* 46(4): 532-548.
7. Al-Mousawi, A. M., G. A. Kulp, L. K. Branski, R. Kraft, G. A. Mecott, F. N. Williams, D. N. Herndon and M. G. Jeschke (2010). "Impact of anesthesia, analgesia, and euthanasia technique on the inflammatory cytokine profile in a rodent model of severe burn injury." *Shock* 34(3): 261-268.
8. Alexander, M., I. H. Chaudry and M. G. Schwacha (2002). "Relationships between burn size, immunosuppression, and macrophage hyperactivity in a murine model of thermal injury." *Cell Immunol* 220(1): 63-69.
9. Aloui, C., A. Prigent, C. Sut, S. Tariket, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, Y. Richard, F. Cognasse, S. Laradi and O. Garraud (2014). "The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion." *Int J Mol Sci* 15(12): 22342-22364.
10. Althouse, A. D. (2016). "Adjust for Multiple Comparisons? It's Not That Simple." *The Annals of Thoracic Surgery* 101(5): 1644-1645.
11. Amarnath, S., L. Dong, J. Li, Y. Wu and W. Chen (2007). "Endogenous TGF-beta activation by reactive oxygen species is key to Foxp3 induction in TCR-stimulated and HIV-1-infected human CD4+CD25- T cells." *Retrovirology* 4: 57.
12. Andonegui, G., S. M. Kerfoot, K. McNagny, K. V. Ebbert, K. D. Patel and P. Kubes (2005). "Platelets express functional Toll-like receptor-4." *Blood* 106(7): 2417-2423.
13. Andre, P. (2004). "P-selectin in haemostasis." *Br J Haematol* 126(3): 298-306.
14. Andre, P., K. S. Prasad, C. V. Denis, M. He, J. M. Papalia, R. O. Hynes, D. R. Phillips and D. D. Wagner (2002). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." *Nat Med* 8(3): 247-252.
15. Angiari, S., T. Donnarumma, B. Rossi, S. Dusi, E. Pietronigro, E. Zenaro, V. Della Bianca, L. Toffali, G. Piacentino, S. Budui, P. Rennert, S. Xiao, C. Laudanna, J. M. Casasnovas, V. K. Kuchroo and G. Constantin (2014). "TIM-1 glycoprotein binds the adhesion receptor P-selectin and mediates T cell trafficking during inflammation and autoimmunity." *Immunity* 40(4): 542-553.
16. Angiari, S., B. Rossi, L. Piccio, B. H. Zinselmeyer, S. Budui, E. Zenaro, V. Della Bianca, S. D. Bach, E. Scarpini, M. Bolomini-Vittori, G. Piacentino, S. Dusi, C. Laudanna, A. H. Cross, M. J. Miller and G. Constantin (2013). "Regulatory T cells suppress the late phase of the immune response in lymph nodes through P-selectin glycoprotein ligand-1." *J Immunol* 191(11): 5489-5500.
17. Au-Yeung, B. B., S. Deindl, L. Y. Hsu, E. H. Palacios, S. E. Levin, J. Kuriyan and A. Weiss (2009). "The structure, regulation, and function of ZAP-70." *Immunol Rev* 228(1): 41-57.
18. Azimi, M., S. Aslani, S. Mortezaigholi, A. Salek, M. R. Javan, A. Rezaeiemanesh, M. Ghaedi, M. Gholamzad and E. Salehi (2016). "Identification, Isolation, and Functional Assay of Regulatory T Cells." *Immunol Invest* 45(7): 584-602.

19. Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." *J Immunol* 167(3): 1245-1253.
20. Baier, G., D. Telford, L. Giampa, K. M. Coggeshall, G. Baier-Bitterlich, N. Isakov and A. Altman (1993). "Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells." *J Biol Chem* 268(7): 4997-5004.
21. Baker, C. C., L. Oppenheimer, B. Stephens, F. R. Lewis and D. D. Trunkey (1980). "Epidemiology of trauma deaths." *Am J Surg* 140(1): 144-150.
22. Bayer, A. L., J. Y. Lee, A. de la Barrera, C. D. Surh and T. R. Malek (2008). "A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells." *J Immunol* 181(1): 225-234.
23. Belkaid, Y. and G. Oldenhove (2008). "Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells." *Immunity* 29(3): 362-371.
24. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* 27(1): 20-21.
25. Benoist, C. and D. Mathis (2012). "Treg cells, life history, and diversity." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9): a007021.
26. Bensinger, S. J., P. T. Walsh, J. Zhang, M. Carroll, R. Parsons, J. C. Rathmell, C. B. Thompson, M. A. Burchill, M. A. Farrar and L. A. Turka (2004). "Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 172(9): 5287-5296.
27. Bergmann, C. B., F. Hefele, M. Unger, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven and M. Hanschen (2016). "Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model." *Immunol Res* 64(2): 508-517.
28. Berthet, J., P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, C. A. Arthaud, M. A. Eyraud, F. Zeni, B. Pozzetto, A. McNicol, O. Garraud and F. Cognasse (2012). "Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion." *Clin Immunol* 145(3): 189-200.
29. Bishop, G. A., C. R. Moore, P. Xie, L. L. Stunz and Z. J. Kraus (2007). "TRAF proteins in CD40 signaling." *Adv Exp Med Biol* 597: 131-151.
30. Blair, P., S. Rex, O. Vitseva, L. Beaulieu, K. Tanriverdi, S. Chakrabarti, C. Hayashi, C. A. Genco, M. Iafrati and J. E. Freedman (2009). "Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase." *Circ Res* 104(3): 346-354.
31. Bock, M., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Kalbitz, B. Relja, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven and M. Hanschen (2018). "The posttraumatic activation of CD4+ T regulatory cells is modulated by TNFR2- and TLR4-dependent pathways, but not by IL-10." *Cell Immunol* 331: 137-145.
32. Bone, R. C. (1996). "Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)." *Ann Intern Med* 125(8): 680-687.
33. Bone, R. C., C. J. Grodzin and R. A. Balk (1997). "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." *Chest* 112(1): 235-243.
34. Boshkov, L. K., J. G. Kelton and P. F. Halloran (1992). "HLA-DR expression by platelets in acute idiopathic thrombocytopenic purpura." *Br J Haematol* 81(4): 552-557.
35. Boudreau, R. M., M. Johnson, R. Veile, L. A. Friend, H. Goetzman, T. A. Pritts, C. C. Caldwell, A. T. Makley and M. D. Goodman (2017). "Impact of tranexamic acid on coagulation and inflammation in murine models of traumatic brain injury and hemorrhage." *J Surg Res* 215: 47-54.
36. Boumpas, D. T., R. Furie, S. Manzi, G. G. Illei, D. J. Wallace, J. E. Balow and A. Vaishnav (2003). "A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis." *Arthritis Rheum* 48(3): 719-727.
37. Boyman, O. and J. Sprent (2012). "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system." *Nat Rev Immunol* 12(3): 180-190.

38. Brohi, K., J. Singh, M. Heron and T. Coats (2003). "Acute traumatic coagulopathy." *J Trauma* 54(6): 1127-1130.
39. Brown, L. M., M. S. Call, M. Margaret Knudson, M. J. Cohen, J. B. Holcomb, C. E. Wade, K. J. Brasel, G. Vercruyssen, J. MacLeod, R. P. Dutton, J. R. Hess, J. C. Duchesne, N. E. McSwain, P. Muskat, J. Johannigam, H. M. Cryer, A. Tillou, J. F. Pittet, M. A. De Moya, M. A. Schreiber, B. Tieu, S. Brundage, L. M. Napolitano, M. Brunsvold, M. Brunsvold, G. Beilman, A. B. Peitzman, M. S. Zenait, J. Sperry, L. Alarcon, M. A. Croce, J. P. Minei, R. Kozar, E. A. Gonzalez, R. M. Stewart, S. M. Cohn, J. E. Mickalek, E. M. Bulger, B. A. Cotton, T. C. Nunez, R. Ivatury, J. W. Meredith, P. Miller, G. J. Pomper and B. Marin (2011). "A normal platelet count may not be enough: the impact of admission platelet count on mortality and transfusion in severely injured trauma patients." *J Trauma* 71(2 Suppl 3): S337-342.
40. Brun-Buisson, C. (2000). "The epidemiology of the systemic inflammatory response." *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S64-74.
41. Bull, C., T. J. Boltje, M. Wassink, A. M. de Graaf, F. L. van Delft, M. H. den Brok and G. J. Adema (2013). "Targeting aberrant sialylation in cancer cells using a fluorinated sialic acid analog impairs adhesion, migration, and in vivo tumor growth." *Mol Cancer Ther* 12(10): 1935-1946.
42. Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar and M. A. Farrar (2007). "IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* 178(1): 280-290.
43. Burggraf, M., A. Payas, M. D. Kauther, C. Schoeneberg and S. Lendemans (2015). "Evaluation of clotting factor activities early after severe multiple trauma and their correlation with coagulation tests and clinical data." *World J Emerg Surg* 10: 43.
44. Busuttill, R. W., G. S. Lipshutz, J. W. Kupiec-Weglinski, S. Ponthieux, D. W. Gjertson, C. Cheadle, T. Watkins, E. Ehrlich, E. Katz, E. C. Squiers, H. Rabb and S. Hemmerich (2011). "rPSGL-Ig for improvement of early liver allograft function: a double-blind, placebo-controlled, single-center phase II study." *Am J Transplant* 11(4): 786-797.
45. Calatzis, A., M. Spannagl and M. Vorweg (2013). "ROTEM® Analyse Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen."
46. Campbell, D. J. (2015). "Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis." *J Immunol* 195(6): 2507-2513.
47. Caretto, D., S. D. Katzman, A. V. Villarino, E. Gallo and A. K. Abbas (2010). "Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells." *J Immunol* 184(1): 30-34.
48. Carlow, D. A., M. C. Tra and H. J. Ziltener (2018). "A cell-extrinsic ligand acquired by activated T cells in lymph node can bridge L-selectin and P-selectin." *PLoS One* 13(10): e0205685.
49. Caudrillier, A., K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb and M. R. Looney (2012). "Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury." *J Clin Invest* 122(7): 2661-2671.
50. Chakraborty, R., C. Rooney, G. Dotti and B. Savoldo (2012). "Changes in chemokine receptor expression of regulatory T cells after ex vivo culture." *J Immunother* 35(4): 329-336.
51. Chan, A. C., M. Dalton, R. Johnson, G. H. Kong, T. Wang, R. Thoma and T. Kurosaki (1995). "Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function." *Embo j* 14(11): 2499-2508.
52. Chang, R., J. C. Cardenas, C. E. Wade and J. B. Holcomb (2016). "Advances in the understanding of trauma-induced coagulopathy." *Blood* 128(8): 1043-1049.
53. Chapman, L. M., A. A. Aggrey, D. J. Field, K. Srivastava, S. Ture, K. Yui, D. J. Topham, W. M. Baldwin, 3rd and C. N. Morrell (2012). "Platelets present antigen in the context of MHC class I." *J Immunol* 189(2): 916-923.
54. Chatzigeorgiou, A., M. Lyberi, G. Chatzilymperis, A. Nezos and E. Kamper (2009). "CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease." *Biofactors* 35(6): 474-483.

55. Chen, L. and D. B. Flies (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." *Nat Rev Immunol* 13(4): 227-242.
56. Chen, S. Y., Z. Feng and X. Yi (2017). "A general introduction to adjustment for multiple comparisons." *J Thorac Dis* 9(6): 1725-1729.
57. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* 198(12): 1875-1886.
58. Choileain, N. N., M. MacConmara, Y. Zang, T. J. Murphy, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2005). "Enhanced Regulatory T Cell Activity Is an Element of the Host Response to Injury." *The Journal of Immunology* 176(1): 225-236.
59. Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devlin, C. J. Doig, F. H. Green and P. Kubers (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." *Nat Med* 13(4): 463-469.
60. Cohen, M. J., M. Kutcher, B. Redick, M. Nelson, M. Call, M. M. Knudson, M. A. Schreiber, E. M. Bulger, P. Muskat, L. H. Alarcon, J. G. Myers, M. H. Rahbar, K. J. Brasel, H. A. Phelan, D. J. del Junco, E. E. Fox, C. E. Wade, J. B. Holcomb, B. A. Cotton and N. Matijevic (2013). "Clinical and mechanistic drivers of acute traumatic coagulopathy." *J Trauma Acute Care Surg* 75(1 Suppl 1): S40-47.
61. Collighan, N., P. V. Giannoudis, O. Kourgeraki, S. L. Perry, P. J. Guillou and M. C. Bellamy (2004). "Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis." *Br J Surg* 91(6): 762-768.
62. Cotton, B. A., J. A. Harvin, V. Kostousouv, K. M. Minei, Z. A. Radwan, H. Schochl, C. E. Wade, J. B. Holcomb and N. Matijevic (2012). "Hyperfibrinolysis at admission is an uncommon but highly lethal event associated with shock and prehospital fluid administration." *J Trauma Acute Care Surg* 73(2): 365-370; discussion 370.
63. Cox, G. (1996). "IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils." *Am J Physiol* 271(4 Pt 1): L566-571.
64. Crellin, N. K., R. V. Garcia and M. K. Levings (2007). "Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells." *Blood* 109(5): 2014-2022.
65. Crellin, N. K., R. V. Garcia and M. K. Levings (2007). "Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells." *J Immunol Methods* 324(1-2): 92-104.
66. Cretney, E., A. Kallies and S. L. Nutt (2013). "Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells." *Trends Immunol* 34(2): 74-80.
67. Cupic, V., M. Colic, L. Pavicic, D. Vucevic and V. M. Varagic (2001). "Immunomodulatory effect of xylazine, an alpha(2) adrenergic agonist, on rat spleen cells in culture." *J Neuroimmunol* 113(1): 19-29.
68. Czapiga, M., A. D. Kirk and J. Lekstrom-Himes (2004). "Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation." *Exp Hematol* 32(2): 135-139.
69. Daly, M. E. (2011). "Determinants of platelet count in humans." *Haematologica* 96(1): 10-13.
70. Danese, S., C. de la Motte, B. M. Reyes, M. Sans, A. D. Levine and C. Focchi (2004). "Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification." *J Immunol* 172(4): 2011-2015.
71. Datta, S. K. and S. L. Kalled (1997). "CD40-CD40 ligand interaction in autoimmune disease." *Arthritis Rheum* 40(10): 1735-1745.
72. Degauque, N., C. Mariat, J. Kenny, D. Zhang, W. Gao, M. D. Vu, S. Alexopoulos, M. Oukka, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, V. Kuchroo, X. X. Zheng and T. B. Strom (2008). "Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice." *J Clin Invest* 118(2): 735-741.

73. Demetriades, D., J. Murray, K. Charalambides, K. Alo, G. Velmahos, P. Rhee and L. Chan (2004). "Trauma fatalities: time and location of hospital deaths." *J Am Coll Surg* 198(1): 20-26.
74. Deppermann, C. and P. Kubes (2016). "Platelets and infection." *Semin Immunol* 28(6): 536-545.
75. Diaz, J. A., S. K. Wroblewski, C. M. Alvarado, A. E. Hawley, N. K. Doornbos, P. A. Lester, S. E. Lowe, J. E. Gabriel, K. J. Roelofs, P. K. Henke, R. G. Schaub, T. W. Wakefield and D. D. Myers, Jr. (2015). "P-selectin inhibition therapeutically promotes thrombus resolution and prevents vein wall fibrosis better than enoxaparin and an inhibitor to von Willebrand factor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(4): 829-837.
76. Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory Cytokines." *Chest* 118(2): 503-508.
77. Duerschmied, D., C. Bode and I. Ahrens (2014). "Immune functions of platelets." *Thromb Haemost* 112(4): 678-691.
78. Dunlop, L. C., M. P. Skinner, L. J. Bendall, E. J. Favalaro, P. A. Castaldi, J. J. Gorman, J. R. Gamble, M. A. Vadas and M. C. Berndt (1992). "Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein." *J Exp Med* 175(4): 1147-1150.
79. Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo and R. J. Noelle (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." *Immunol Rev* 229(1): 152-172.
80. Elzey, B. D., J. F. Grant, H. W. Sinn, B. Nieswandt, T. J. Waldschmidt and T. L. Ratliff (2005). "Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation." *J Leukoc Biol* 78(1): 80-84.
81. Elzey, B. D., T. L. Ratliff, J. M. Sowa and S. A. Crist (2011). "Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity." *Thromb Res* 127(3): 180-183.
82. Elzey, B. D., D. L. Sprague and T. L. Ratliff (2005). "The emerging role of platelets in adaptive immunity." *Cell Immunol* 238(1): 1-9.
83. Elzey, B. D., J. Tian, R. J. Jensen, A. K. Swanson, J. R. Lees, S. R. Lentz, C. S. Stein, B. Nieswandt, Y. Wang, B. L. Davidson and T. L. Ratliff (2003). "Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity." *Immunity* 19(1): 9-19.
84. Engelmann, B. and S. Massberg (2013). "Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity." *Nat Rev Immunol* 13(1): 34-45.
85. Evangelista, V., S. Manarini, R. Sideri, S. Rotondo, N. Martelli, A. Piccoli, L. Totani, P. Piccardoni, D. Vestweber, G. de Gaetano and C. Cerletti (1999). "Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule." *Blood* 93(3): 876-885.
86. Faist, E., C. Schinkel and S. Zimmer (1996). "Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation." *World J Surg* 20(4): 454-459.
87. Firan, M., S. Dhillon, P. Estess and M. H. Siegelman (2006). "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44." *Blood* 107(2): 619-627.
88. Flohe, S. B., S. Flohe and F. U. Schade (2008). "Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms." *Innate Immunol* 14(6): 333-344.
89. Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 4(4): 330-336.
90. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." *Nat Immunol* 6(11): 1142-1151.
91. Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." *J Clin Invest* 109(3): 295-299.
92. Friedrich, M., D. Bock, S. Philipp, N. Ludwig, R. Sabat, K. Wolk, S. Schroeter-Maas, E. Aydt, S. Kang, T. N. Dam, R. Zahlten, W. Sterry and G. Wolff (2006). "Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man." *Arch Dermatol Res* 297(8): 345-351.

93. Fujimi, S., M. P. MacConmara, A. A. Maung, Y. Zang, J. A. Mannick, J. A. Lederer and P. H. Lapchak (2006). "Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury." *Blood* 107(11): 4399-4406.
94. Furie, B., B. C. Furie and R. Flaumenhaft (2001). "A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion." *Thromb Haemost* 86(1): 214-221.
95. Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze and J. J. Lafaille (2002). "Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function." *J Exp Med* 196(6): 851-857.
96. Gaber, A. O., S. Mulgaonkar, B. D. Kahan, E. S. Woodle, R. Alloway, I. Bajjoka, S. Jensik, G. B. Klintmalm, P. R. Patton, A. Wiseman, G. Lipshutz, J. Kupiec-Weglinski, L. W. Gaber, E. Katz, W. Irish, E. C. Squiers and S. Hemmerich (2011). "YSPSL (rPSGL-Ig) for improvement of early renal allograft function: a double-blind, placebo-controlled, multi-center Phase IIa study." *Clin Transplant* 25(4): 523-533.
97. Galeano, B., R. Klootwijk, I. Manoli, M. Sun, C. Ciccone, D. Darvish, M. F. Starost, P. M. Zervas, V. J. Hoffmann, S. Hoogstraten-Miller, D. M. Krasnewich, W. A. Gahl and M. Huizing (2007). "Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine." *J Clin Invest* 117(6): 1585-1594.
98. Garraud, O., H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, J. M. Cavaillon and F. Cognasse (2013). "Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology?" *Crit Care* 17(4): 236.
99. Gerdes, N., T. Seijkens, D. Lievens, M. J. Kuijpers, H. Winkels, D. Projahn, H. Hartwig, L. Beckers, R. T. Megens, L. Boon, R. J. Noelle, O. Soehnlein, J. W. Heemskerk, C. Weber and E. Lutgens (2016). "Platelet CD40 Exacerbates Atherosclerosis by Transcellular Activation of Endothelial Cells and Leukocytes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36(3): 482-490.
100. Giannoudis, P. V., F. Hildebrand and H. C. Pape (2004). "Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma." *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 86-B(3): 313.
101. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* 174(4): 1783-1786.
102. Gonzalez, E., E. E. Moore, H. B. Moore, M. P. Chapman, T. L. Chin, A. Ghasabyan, M. V. Wohlaer, C. C. Barnett, D. D. Bensard, W. L. Biffl, C. C. Burlew, J. L. Johnson, F. M. Pieracci, G. J. Jurkovich, A. Banerjee, C. C. Silliman and A. Sauaia (2016). "Goal-directed Hemostatic Resuscitation of Trauma-induced Coagulopathy: A Pragmatic Randomized Clinical Trial Comparing a Viscoelastic Assay to Conventional Coagulation Assays." *Ann Surg* 263(6): 1051-1059.
103. Gratz, I. K., H. A. Truong, S. H. Yang, M. M. Maurano, K. Lee, A. K. Abbas and M. D. Rosenblum (2013). "Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues." *J Immunol* 190(9): 4483-4487.
104. Greco, E., E. Lupia, O. Bosco, B. Vizio and G. Montrucchio (2017). "Platelets and Multi-Organ Failure in Sepsis." *Int J Mol Sci* 18(10).
105. Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1996). "The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation." *Immunol Rev* 153: 85-106.
106. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* 21(4): 589-601.
107. Guery, L. and S. Hugues (2015). "Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity." *Biomed Res Int* 2015: 314620.
108. Guiducci, C., B. Valzasina, H. Dislich and M. P. Colombo (2005). "CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2." *Eur J Immunol* 35(2): 557-567.
109. Guignant, C., A. Lepape, X. Huang, H. Kherouf, L. Denis, F. Poitevin, C. Malcus, A. Cheron, B. Allaouchiche, F. Gueyffier, A. Ayala, G. Monneret and F. Venet (2011).

- "Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients." *Crit Care* 15(2): R99.
110. Guo, Z., E. Kavanagh, Y. Zang, S. M. Dolan, S. J. Kriynovich, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2003). "Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo." *J Immunol* 171(8): 3983-3990.
 111. Haas, T., D. Fries, K. A. Tanaka, L. Asmis, N. S. Curry and H. Schochl (2015). "Usefulness of standard plasma coagulation tests in the management of perioperative coagulopathic bleeding: is there any evidence?" *Br J Anaesth* 114(2): 217-224.
 112. Hall, B. M. (2015). "T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells." *Clin J Am Soc Nephrol* 10(11): 2050-2064.
 113. Hanschen, M., G. Tajima, F. O'Leary, K. Hoang, K. Ikeda and J. A. Lederer (2012). "Phospho-flow cytometry based analysis of differences in T cell receptor signaling between regulatory T cells and CD4+ T cells." *J Immunol Methods* 376(1-2): 1-12.
 114. Hanschen, M., G. Tajima, F. O'Leary, K. Ikeda and J. A. Lederer (2011). "Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells." *Shock* 35(3): 252-257.
 115. Hayashi, K. and A. Altman (2007). "Protein kinase C theta (PKCtheta): a key player in T cell life and death." *Pharmacol Res* 55(6): 537-544.
 116. Henn, V., J. R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus and R. A. Kroczeck (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." *Nature* 391(6667): 591-594.
 117. Henn, V., S. Steinbach, K. Buchner, P. Presek and R. A. Kroczeck (2001). "The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40." *Blood* 98(4): 1047-1054.
 118. Hensler, T., S. Sauerland, B. Bouillon, M. Raum, D. Rixen, H. J. Helling, J. Andermahr and E. A. Neugebauer (2002). "Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase." *J Trauma* 52(5): 962-970.
 119. Herter, J. M., J. Rossaint and A. Zarbock (2014). "Platelets in inflammation and immunity." *J Thromb Haemost* 12(11): 1764-1775.
 120. Heuer, J. G., T. Zhang, J. Zhao, C. Ding, M. Cramer, K. L. Justen, S. L. Vonderfecht and S. Na (2005). "Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis." *J Immunol* 174(11): 7141-7146.
 121. Hickman, S. P., J. Yang, R. M. Thomas, A. D. Wells and L. A. Turka (2006). "Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* 177(4): 2186-2194.
 122. Hilf, N., H. Singh-Jasuja, P. Schwarzmaier, C. Gouttefangeas, H.-G. Rammensee and H. Schild (2002). "Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation." *Blood* 99(10): 3676.
 123. Hirsiger, S., H. P. Simmen, C. M. Werner, G. A. Wanner and D. Rittirsch (2012). "Danger signals activating the immune response after trauma." *Mediators Inflamm* 2012: 315941.
 124. Hoeppli, R. E., D. Wu, L. Cook and M. K. Levings (2015). "The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome." *Front Immunol* 6: 61.
 125. Hoover, L., G. V. Bochicchio, L. M. Napolitano, M. Joshi, K. Bochicchio, W. Meyer and T. M. Scalea (2006). "Systemic Inflammatory Response Syndrome and Nosocomial Infection in Trauma." *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 61(2): 310-317.
 126. Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 299(5609): 1057-1061.
 127. Horrillo, A., T. Fontela, E. G. Arias-Salgado, D. Llobat, G. Porrás, M. S. Ayuso and C. Gonzalez-Manchon (2014). "Generation of mice with conditional ablation of the Cd40lg gene: new insights on the role of CD40L." *Transgenic Res* 23(1): 53-66.

128. Hotchkiss, R. S., G. Monneret and D. Payen (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 13(12): 862-874.
129. Huang, C. C., Y. F. Lu, S. N. Wen, W. C. Hsieh, Y. C. Lin, M. R. Liu, E. Chiang, C. N. Chang and R. H. Lin (2005). "A novel apoptosis-inducing anti-PSGL-1 antibody for T cell-mediated diseases." *Eur J Immunol* 35(7): 2239-2249.
130. Hulspas, R., M. R. O'Gorman, B. L. Wood, J. W. Gratama and D. R. Sutherland (2009). "Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry." *Cytometry B Clin Cytom* 76(6): 355-364.
131. Iannacone, M. (2016). "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity." *Semin Immunol* 28(6): 555-560.
132. Ina Aschenbrenner, P. D. P. B. (2012). "Polytrauma." Retrieved 15.01.2020, 2020, from <https://www.dgu-online.de/patienten/haeufige-diagnosen/schwerverletzte/polytrauma.html>.
133. Inwald, D. P., A. McDowall, M. J. Peters, R. E. Callard and N. J. Klein (2003). "CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation." *Circ Res* 92(9): 1041-1048.
134. Isakov, N. and A. Altman (2002). "Protein kinase C(theta) in T cell activation." *Annu Rev Immunol* 20: 761-794.
135. Jacoby, R. C., J. T. Owings, J. Holmes, F. D. Battistella, R. C. Gosselin and T. G. Paglieroni (2001). "Platelet activation and function after trauma." *J Trauma* 51(4): 639-647.
136. Jarvinen, L. Z., B. R. Blazar, O. A. Adeyi, T. B. Strom and R. J. Noelle (2003). "CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance." *Transplantation* 76(9): 1375-1379.
137. Jin, R., A. Y. Xiao, Z. Song, S. Yu, J. Li, M. Z. Cui and G. Li (2018). "Platelet CD40 Mediates Leukocyte Recruitment and Neointima Formation after Arterial Denudation Injury in Atherosclerosis-Prone Mice." *Am J Pathol* 188(1): 252-263.
138. Johansson, P. I. and S. R. Ostrowski (2010). "Acute coagulopathy of trauma: balancing progressive catecholamine induced endothelial activation and damage by fluid phase anticoagulation." *Med Hypotheses* 75(6): 564-567.
139. Johansson, P. I., A. M. Sorensen, A. Perner, K. L. Welling, M. Wanscher, C. F. Larsen and S. R. Ostrowski (2012). "High sCD40L levels early after trauma are associated with enhanced shock, sympathoadrenal activation, tissue and endothelial damage, coagulopathy and mortality." *J Thromb Haemost* 10(2): 207-216.
140. Josefowicz, S. Z., L. F. Lu and A. Y. Rudensky (2012). "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function." *Annu Rev Immunol* 30: 531-564.
141. Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
142. Kawai, T., D. Andrews, R. B. Colvin, D. H. Sachs and A. B. Cosimi (2000). "Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand." *Nat Med* 6(2): 114.
143. Kawasaki, T., M. Ogata, C. Kawasaki, J. Ogata, Y. Inoue and A. Shigematsu (1999). "Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro." *Anesth Analg* 89(3): 665-669.
144. Keane, C., D. Tilley, A. Cunningham, A. Smolenski, A. Kadioglu, D. Cox, H. F. Jenkinson and S. W. Kerrigan (2010). "Invasive *Streptococcus pneumoniae* trigger platelet activation via Toll-like receptor 2." *J Thromb Haemost* 8(12): 2757-2765.
145. Keel, M. and O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." *Injury* 36(6): 691-709.
146. Keene, D. D., G. R. Nordmann and T. Woolley (2013). "Rotational thromboelastometry-guided trauma resuscitation." *Curr Opin Crit Care* 19(6): 605-612.
147. Kennedy, M. A. (2010). "A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40(3): 369-379.
148. Khandoga, A., M. Hanschen, J. S. Kessler and F. Krombach (2006). "CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets." *Hepatology* 43(2): 306-315.
149. Klingler, M. H. (1997). "Platelets and inflammation." *Anat Embryol (Berl)* 196(1): 1-11.

150. Koenen, H. J., R. L. Smeets, P. M. Vink, E. van Rijssen, A. M. Boots and I. Joosten (2008). "Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells." *Blood* 112(6): 2340-2352.
151. Kohm, A. P., P. A. Carpentier, H. A. Anger and S. D. Miller (2002). "Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *The Journal of Immunology* 169(9): 4712-4716.
152. Kohm, A. P. and S. D. Miller (2003). "Role of ICAM-1 and P-selectin expression in the development and effector function of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells." *Journal of Autoimmunity* 21(3): 261-271.
153. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* 27: 485-517.
154. Kornblith, L. Z., M. E. Kutcher, B. J. Redick, C. S. Calfee, R. F. Vilardi and M. J. Cohen (2014). "Fibrinogen and platelet contributions to clot formation: implications for trauma resuscitation and thromboprophylaxis." *J Trauma Acute Care Surg* 76(2): 255-256; discussion 262-253.
155. Kraj, P. and L. Ignatowicz (2018). "The mechanisms shaping the repertoire of CD4⁽⁺⁾ Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells." *Immunology* 153(3): 290-296.
156. Kroczek, R. A., H. W. Mages and A. Hutloff (2004). "Emerging paradigms of T-cell co-stimulation." *Curr Opin Immunol* 16(3): 321-327.
157. Kumanogoh, A., X. Wang, I. Lee, C. Watanabe, M. Kamanaka, W. Shi, K. Yoshida, T. Sato, S. Habu, M. Itoh, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi and H. Kikutani (2001). "Increased T Cell Autoreactivity in the Absence of CD40-CD40 Ligand Interactions: A Role of CD40 in Regulatory T Cell Development." *The Journal of Immunology* 166(1): 353-360.
158. Kumar, A., M. P. Villani, U. K. Patel, J. C. Keith, Jr. and R. G. Schaub (1999). "Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model." *Circulation* 99(10): 1363-1369.
159. Kutcher, M. E., B. J. Redick, R. C. McCreery, I. M. Crane, M. D. Greenberg, L. M. Cachola, M. F. Nelson and M. J. Cohen (2012). "Characterization of platelet dysfunction after trauma." *J Trauma Acute Care Surg* 73(1): 13-19.
160. Kutlar, A. and S. H. Embury (2014). "Cellular adhesion and the endothelium: P-selectin." *Hematol Oncol Clin North Am* 28(2): 323-339.
161. Lakhin, A. V., V. Z. Tarantul and L. V. Gening (2013). "Aptamers: problems, solutions and prospects." *Acta Naturae* 5(4): 34-43.
162. Lederer, J. A., M. L. Rodrick and J. A. Mannick (1999). "The effects of injury on the adaptive immune response." *Shock* 11(3): 153-159.
163. Lenz, A., G. A. Franklin and W. G. Cheadle (2007). "Systemic inflammation after trauma." *Injury* 38(12): 1336-1345.
164. Letourneau, S., C. Krieg, G. Pantaleo and O. Boyman (2009). "IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets." *J Allergy Clin Immunol* 123(4): 758-762.
165. Levine, A. G., A. Arvey, W. Jin and A. Y. Rudensky (2014). "Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function." *Nat Immunol* 15(11): 1070-1078.
166. Levings, M. K., R. Sangregorio and M. G. Roncarolo (2001). "Human cd25⁽⁺⁾cd4⁽⁺⁾ t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." *J Exp Med* 193(11): 1295-1302.
167. Levy, J. A. (2009). "The unexpected pleiotropic activities of RANTES." *J Immunol* 182(7): 3945-3946.
168. Ley, K. and G. S. Kansas (2004). "Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation." *Nat Rev Immunol* 4(5): 325-335.
169. Li, L., W. R. Godfrey, S. B. Porter, Y. Ge, C. H. June, B. R. Blazar and V. A. Boussiotis (2005). "CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy." *Blood* 106(9): 3068-3073.
170. Li, M. O. and A. Y. Rudensky (2016). "T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function." *Nat Rev Immunol* 16(4): 220-233.
171. Li, N. (2008). "Platelet-lymphocyte cross-talk." *J Leukoc Biol* 83(5): 1069-1078.

172. Li, N. (2013). "CD4⁺ T cells in atherosclerosis: regulation by platelets." *Thromb Haemost* 109(6): 980-990.
173. Li, N., Q. Ji and P. Hjerdahl (2006). "Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations." *J Thromb Haemost* 4(4): 874-881.
174. Li, R., W. C. Chen, X. Q. Pang, W. Y. Tian and X. G. Zhang (2011). "Influence of sCD40L on gastric cancer cell lines." *Mol Biol Rep* 38(8): 5459-5464.
175. Li, W., T. L. Carlson and W. R. Green (2011). "Stimulation-dependent induction of CD154 on a subset of CD4⁺ FoxP3⁺ T-regulatory cells." *Int Immunopharmacol* 11(9): 1205-1210.
176. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." *J Immunol* 180(9): 5916-5926.
177. Lievens, D., A. Zerneck, T. Seijkens, O. Soehnlein, L. Beckers, I. C. Munnix, E. Wijnands, P. Goossens, R. van Kruchten, L. Thevissen, L. Boon, R. A. Flavell, R. J. Noelle, N. Gerdes, E. A. Biessen, M. J. Daemen, J. W. Heemskerk, C. Weber and E. Lutgens (2010). "Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis." *Blood* 116(20): 4317-4327.
178. Lindmark, E., T. Tenno and A. Siegbahn (2000). "Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(10): 2322-2328.
179. Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche and W. Chen (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells." *Nat Immunol* 9(6): 632-640.
180. Liverani, E., L. E. Kilpatrick, A. Y. Tsygankov and S. P. Kunapuli (2014). "The role of P2Y₁(2) receptor and activated platelets during inflammation." *Curr Drug Targets* 15(7): 720-728.
181. Luddington, R. J. (2005). "Thrombelastography/thromboelastometry." *Clin Lab Haematol* 27(2): 81-90.
182. Lukasik, Z. M., M. Makowski and J. S. Makowska (2018). "From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders." *Rheumatol Int* 38(6): 959-974.
183. Ma, L. and A. Dorling (2012). "The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation." *Semin Immunopathol* 34(1): 63-72.
184. MacConmara, M. P., A. A. Maung, S. Fujimi, A. M. McKenna, A. Delisle, P. H. Lapchak, S. Rogers, J. A. Lederer and J. A. Mannick (2006). "Increased CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity." *Ann Surg* 244(4): 514-523.
185. MacConmara, M. P., G. Tajima, F. O'Leary, A. J. Delisle, A. M. McKenna, C. G. Stallwood, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2011). "Regulatory T cells suppress antigen-driven CD4 T cell reactivity following injury." *J Leukoc Biol* 89(1): 137-147.
186. Malek, T. R., A. Yu, V. Vincek, P. Scibelli and L. Kong (2002). "CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2." *Immunity* 17(2): 167-178.
187. Markogiannakis, H., E. Sanidas, E. Messaris, D. Koutentakis, K. Alpantaki, A. Kafetzakis and D. Tsiftsis (2006). "Motor vehicle trauma: analysis of injury profiles by road-user category." *Emerg Med J* 23(1): 27-31.
188. Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low and R. Thomas (2003). "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10." *Immunity* 18(1): 155-167.
189. Martin, S., R. Agarwal, G. Murugaiyan and B. Saha (2010). "CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection." *J Immunol* 185(1): 551-559.
190. Martin-Fontecha, A., D. Baumjohann, G. Guarda, A. Reboldi, M. Hons, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2008). "CD40L⁺ CD4⁺ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming." *J Exp Med* 205(11): 2561-2574.

191. Matarese, G., V. De Rosa and A. La Cava (2008). "Regulatory CD4 T cells: sensing the environment." *Trends Immunol* 29(1): 12-17.
192. Matsumoto, M., M. Miyasaka and T. Hirata (2009). "P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses." *J Immunol* 183(11): 7204-7211.
193. Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.
194. May, A. E., T. Kalsch, S. Massberg, Y. Herouy, R. Schmidt and M. Gawaz (2002). "Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells." *Circulation* 106(16): 2111-2117.
195. Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes and D. D. Wagner (1993). "Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice." *Cell* 74(3): 541-554.
196. McCarville, J. L. and J. S. Ayres (2018). "Disease tolerance: concept and mechanisms." *Curr Opin Immunol* 50: 88-93.
197. McDermott, D. H. and P. M. Murphy (2000). "Chemokines and their receptors in infectious disease." *Springer Semin Immunopathol* 22(4): 393-415.
198. McFadyen, J. D. and Z. S. Kaplan (2015). "Platelets are not just for clots." *Transfus Med Rev* 29(2): 110-119.
199. Meller, N., Y. Elitzur and N. Isakov (1999). "Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction." *Cell Immunol* 193(2): 185-193.
200. Merten, M. and P. Thiagarajan (2000). "P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates." *Circulation* 102(16): 1931-1936.
201. Mertens, P., A. Maes, J. Nuyts, A. Belmans, W. Desmet, E. Esplugas, F. Charlier, J. Figueras, G. Sambuceti, M. Schwaiger, L. Mortelmans and F. Van de Werf (2006). "Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin, a P-selectin antagonist, as an adjunct to thrombolysis in acute myocardial infarction. The P-Selectin Antagonist Limiting Myonecrosis (PSALM) trial." *Am Heart J* 152(1): 125 e121-128.
202. Michel, N. A., A. Zirlik and D. Wolf (2017). "CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis-An Update." *Front Cardiovasc Med* 4: 40.
203. Monici, M. (2005). "Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications." *Biotechnol Annu Rev* 11: 227-256.
204. Monneret, G., A. L. Debard, F. Venet, J. Bohe, O. Hequet, J. Bienvenu and A. Lepape (2003). "Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis." *Crit Care Med* 31(7): 2068-2071.
205. Montoro-Garcia, S., E. Shantsila, D. Hernandez-Romero, E. Jover, M. Valdes, F. Marin and G. Y. Lip (2014). "Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin." *Br J Haematol* 166(4): 571-580.
206. Moore, F. A. and E. E. Moore (1995). "Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure." *Surg Clin North Am* 75(2): 257-277.
207. Moore, K. L. and L. F. Thompson (1992). "P-selectin (CD62) binds to subpopulations of human memory T lymphocytes and natural killer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 186(1): 173-181.
208. Mueller, D. L., M. K. Jenkins and R. H. Schwartz (1989). "Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy." *Annu Rev Immunol* 7: 445-480.
209. Munford, R. S. and J. Pugin (2001). "Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive." *Am J Respir Crit Care Med* 163(2): 316-321.
210. Murphy, T. J., N. N. Choileain, Y. Zang, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2005). "CD4+CD25+ Regulatory T Cells Control Innate Immune Reactivity after Injury." *The Journal of Immunology* 174(5): 2957-2963.
211. Mustelin, T. and K. Taskén (2003). "Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases." *Biochemical Journal* 371(Pt 1): 15-27.

212. Myers, D., S. Wroblewski, F. Londy, B. Fex, A. Hawley, R. Schaub, L. Greenfield and T. Wakefield (2002). "New and effective treatment of experimentally induced venous thrombosis with anti-inflammatory rPSGL-Ig." *Thromb Haemost* 87(3): 374-382.
213. Nagaya, T., Y. Nakamura, K. Sato, T. Harada, P. L. Choyke and H. Kobayashi (2016). "Improved micro-distribution of antibody-photon absorber conjugates after initial near infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT)." *J Control Release* 232: 1-8.
214. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata and W. Strober (2004). "TGF- 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice." *The Journal of Immunology* 172(2): 834-842.
215. Nasti, T. H., D. C. Bullard and N. Yusuf (2015). "P-selectin enhances growth and metastasis of mouse mammary tumors by promoting regulatory T cell infiltration into the tumors." *Life Sci* 131: 11-18.
216. Neidhardt, R., M. Keel, U. Steckholzer, A. Safret, U. Ungethuen, O. Trentz and W. Ertel (1997). "Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients." *J Trauma* 42(5): 863-870; discussion 870-861.
217. Neunaber, C., C. Zeckey, H. Andruszkow, M. Frink, P. Mommsen, C. Krettek and F. Hildebrand (2011). "Immunomodulation in polytrauma and polymicrobial sepsis - where do we stand?" *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 5(1): 17-25.
218. Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T. B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y. E. Chin and J. Z. Zhang (2013). "Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis." *Nat Med* 19(3): 322-328.
219. Niles, S. E., D. F. McLaughlin, J. G. Perkins, C. E. Wade, Y. Li, P. C. Spinella and J. B. Holcomb (2008). "Increased mortality associated with the early coagulopathy of trauma in combat casualties." *J Trauma* 64(6): 1459-1463; discussion 1463-1455.
220. Nummer, D., E. Suri-Payer, H. Schmitz-Winnenthal, A. Bonertz, L. Galindo, D. Antolovich, M. Koch, M. Buchler, J. Weitz, V. Schirmacher and P. Beckhove (2007). "Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma." *J Natl Cancer Inst* 99(15): 1188-1199.
221. O'Sullivan, S. T., J. A. Lederer, A. F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick and M. L. Rodrick (1995). "Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection." *Ann Surg* 222(4): 482-490; discussion 490-482.
222. Obermajer, N., F. C. Popp, Y. Soeder, J. Haarer, E. K. Geissler, H. J. Schlitt and M. H. Dahlke (2014). "Conversion of Th17 into IL-17A(neg) regulatory T cells: a novel mechanism in prolonged allograft survival promoted by mesenchymal stem cell-supported minimized immunosuppressive therapy." *J Immunol* 193(10): 4988-4999.
223. Ogura, H., T. Kawasaki, H. Tanaka, T. Koh, R. Tanaka, Y. Ozeki, H. Hosotsubo, Y. Kuwagata, T. Shimazu and H. Sugimoto (2001). "Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis." *J Trauma* 50(5): 801-809.
224. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 10113-10118.
225. Opal, S. M., J. P. Sypek, J. C. Keith, Jr., R. G. Schaub, J. E. Palardy and N. A. Parejo (2001). "Evaluation of the safety of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin G fusion protein in experimental models of localized and systemic infection." *Shock* 15(4): 285-290.
226. Oppenheim, J. J., P. Tewary, G. de la Rosa and D. Yang (2007). "Alarmins initiate host defense." *Adv Exp Med Biol* 601: 185-194.
227. Oppenheim, J. J. and D. Yang (2005). "Alarmins: chemotactic activators of immune responses." *Curr Opin Immunol* 17(4): 359-365.
228. Osuchowski, M. F., D. G. Remick, J. A. Lederer, C. H. Lang, A. O. Aasen, M. Aibiki, L. C. Azevedo, S. Bahrami, M. Boros, R. Cooney, S. Cuzzocrea, Y. Jiang, W. G. Junger, H. Hirasawa, R. S. Hotchkiss, X. A. Li, P. Radermacher, H. Redl, R. Salomao, A. Soebandrio, C. Thiemermann, J. L. Vincent, P. Ward, Y. M. Yao, H. P. Yu, B. Zingarelli and I. H. Chaudry (2014). "Abandon the mouse research ship? Not just yet!" *Shock* 41(6): 463-475.

229. Palabrica, T., R. Lobb, B. C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y. M. Hsu, S. A. Sajer and B. Furie (1992). "Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets." *Nature* 359(6398): 848-851.
230. Papaevangelou, J., J. S. Batchelor and A. H. N. Roberts (1995). "Motor vehicle-related burns: a review of 107 cases." *Burns* 21(1): 36-38.
231. Pareti, F. I., A. Capitanio, L. Mannucci, C. Ponticelli and P. M. Mannucci (1980). "Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets." *Am J Med* 69(2): 235-240.
232. Parke, A. L., P. T. Liu and D. V. Parke (2003). "Multiple organ dysfunction syndrome." *Inflammopharmacology* 11(1): 87-95.
233. Patel, M. S., D. Miranda-Nieves, J. Chen, C. A. Haller and E. L. Chaikof (2017). "Targeting P-selectin glycoprotein ligand-1/P-selectin interactions as a novel therapy for metabolic syndrome." *Transl Res* 183: 1-13.
234. Perez-Frias, A., R. Gonzalez-Tajuelo, N. Nunez-Andrade, R. Tejedor, M. J. Garcia-Blanco, E. Vicente-Rabaneda, S. Castaneda, C. Gamallo, J. Silvan, A. Esteban-Villafruela, L. Cubero-Rueda, C. Garcia-Garcia, C. Munoz-Calleja, A. Garcia-Diez and A. Urzainqui (2014). "Development of an autoimmune syndrome affecting the skin and internal organs in P-selectin glycoprotein ligand 1 leukocyte receptor-deficient mice." *Arthritis Rheumatol* 66(11): 3178-3189.
235. Petersen, F., L. Bock, H. D. Flad and E. Brandt (1999). "Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8." *Blood* 94(12): 4020-4028.
236. Ponomarev, E. D. (2018). "Fresh Evidence for Platelets as Neuronal and Innate Immune Cells: Their Role in the Activation, Differentiation, and Deactivation of Th1, Th17, and Tregs during Tissue Inflammation." *Front Immunol* 9: 406.
237. Prasad, K. S., P. Andre, M. He, M. Bao, J. Manganello and D. R. Phillips (2003). "Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12367-12371.
238. Purcell, E. M., S. M. Dolan, S. Kriynovich, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2006). "Burn injury induces an early activation response by lymph node CD4+ T cells." *Shock* 25(2): 135-140.
239. Rauch, U., D. Bonderman, B. Bohrmann, J. J. Badimon, J. Himber, M. A. Riederer and Y. Nemerson (2000). "Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor." *Blood* 96(1): 170-175.
240. Raynor, J., A. Sholl, D. R. Plas, P. Bouillet, C. A. Chougnet and D. A. Hildeman (2013). "IL-15 Fosters Age-Driven Regulatory T Cell Accrual in the Face of Declining IL-2 Levels." *Front Immunol* 4: 161.
241. Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* 192(2): 295-302.
242. Renshaw, B. R., W. C. Fanslow, 3rd, R. J. Armitage, K. A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B. L. Davison and C. R. Maliszewski (1994). "Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice." *J Exp Med* 180(5): 1889-1900.
243. Rex, S., L. M. Beaulieu, D. H. Perlman, O. Vitseva, P. S. Blair, M. E. McComb, C. E. Costello and J. E. Freedman (2009). "Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release." *Thromb Haemost* 102(1): 97-110.
244. Rillahan, C. D., A. Antonopoulos, C. T. Lefort, R. Sonon, P. Azadi, K. Ley, A. Dell, S. M. Haslam and J. C. Paulson (2012). "Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome." *Nat Chem Biol* 8(7): 661-668.
245. Rondina, M. T., A. S. Weyrich and G. A. Zimmerman (2013). "Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases." *Circ Res* 112(11): 1506-1519.
246. Rosenblum, M. D., I. K. Gratz, J. S. Paw, K. Lee, A. Marshak-Rothstein and A. K. Abbas (2011). "Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues." *Nature* 480(7378): 538-542.

247. Roumen, R. M., T. Hendriks, J. van der Ven-Jongekrijg, G. A. Nieuwenhuijzen, R. W. Sauerwein, J. W. van der Meer and R. J. Goris (1993). "Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure." *Ann Surg* 218(6): 769-776.
248. Rumbaugh, K. P., J. A. Griswold, B. H. Iglewski and A. N. Hamood (1999). "Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections." *Infect Immun* 67(11): 5854-5862.
249. Rupp, M. C., C. B. Bergmann, M. Bock, S. Jung, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven and M. Hanschen (2017). "Do CD40L and P-Selectin (CD62P) dependent pathways modulate the response of CD4+ T-Regulatory cells following trauma?" *Shock* 47(6S): 123.
250. Rupp, M. C., C. B. Bergmann, S. Jung, M. Bock, P. Biberthaler, L. Heimann and M. Hanschen (2021). "The posttraumatic response of CD4+ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways." *Cent Eur J Immunol* 46(3): 283-294.
251. Sackstein, R. (2005). "The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm." *Curr Opin Hematol* 12(6): 444-450.
252. Sadallah, S., F. Amicarella, C. Eken, G. Iezzi and J. A. Schifferli (2014). "Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4+T cells into T regulatory cells." *Thromb Haemost* 112(6): 1219-1229.
253. Saemann, M. D., C. Diakos, P. Kelemen, E. Kriehuber, M. Zeyda, G. A. Bohmig, W. H. Horl, T. Baumruker and G. J. Zlabinger (2003). "Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3." *Am J Transplant* 3(11): 1341-1349.
254. Saemann, M. D., P. Kelemen, M. Zeyda, G. Bohmig, G. Staffler and G. J. Zlabinger (2002). "CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited." *Transplant Proc* 34(5): 1407-1408.
255. Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
256. Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." *Nat Rev Immunol* 10(7): 490-500.
257. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-1164.
258. Sakaguchi, S., D. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec and H. Waldmann (2013). "The plasticity and stability of regulatory T cells." *Nat Rev Immunol* 13(6): 461-467.
259. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin and T. Yamaguchi (2009). "Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?" *Int Immunol* 21(10): 1105-1111.
260. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* 12(4): 431-440.
261. Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." *Immunity* 28(3): 402-413.
262. Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowiec, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky and D. J. Campbell (2007). "Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease." *J Exp Med* 204(6): 1335-1347.
263. Schmetterer, K. G., A. Neunkirchner and W. F. Pickl (2012). "Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation." *Faseb j* 26(6): 2253-2276.
264. Schnuriger, B., K. Inaba, G. A. Abdelsayed, T. Lustenberger, B. M. Eberle, G. Barmparas, P. Talving and D. Demetriades (2010). "The impact of platelets on the progression of traumatic intracranial hemorrhage." *J Trauma* 68(4): 881-885.

265. Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." *Cell Mol Life Sci* 58(1): 4-43.
266. Scumpia, P. O., M. J. Delano, K. M. Kelly, K. A. O'Malley, P. A. Efron, P. F. McAuliffe, T. Brusko, R. Ungaro, T. Barker, J. L. Wynn, M. A. Atkinson, W. H. Reeves, M. J. Salzman and L. L. Moldawer (2006). "Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis." *J Immunol* 177(11): 7943-7949.
267. Seijkens, T., D. Engel, M. Tjwa and E. Lutgens (2010). "The role of CD154 in haematopoietic development." *Thromb Haemost* 104(4): 693-701.
268. Semple, J. W., Y. Milev, D. Cosgrave, M. Mody, A. Hornstein, V. Blanchette and J. Freedman (1996). "Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity." *Blood* 87(10): 4245-4254.
269. Serrador, J. M., A. Urzainqui, J. L. Alonso-Lebrero, J. R. Cabrero, M. C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, M. Yanez-Mo and F. Sanchez-Madrid (2002). "A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes." *Eur J Immunol* 32(6): 1560-1566.
270. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi and S. Sakaguchi (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." *J Exp Med* 201(5): 723-735.
271. Shaffer, M. H., R. S. Dupree, P. Zhu, I. Saotome, R. F. Schmidt, A. I. McClatchey, B. D. Freedman and J. K. Burkhardt (2009). "Ezrin and moesin function together to promote T cell activation." *J Immunol* 182(2): 1021-1032.
272. Shashkin, P. N., G. T. Brown, A. Ghosh, G. K. Marathe and T. M. McIntyre (2008). "Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing." *J Immunol* 181(5): 3495-3502.
273. Shatney, C. H. and C. Benner (1985). "Sequential serum complement (C3) and immunoglobulin levels in shock/trauma patients developing acute fulminant systemic sepsis." *Circ Shock* 16(1): 9-17.
274. Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity* 30(5): 636-645.
275. Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent and D. C. Angus (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* 315(8): 801-810.
276. Smook, M. L., P. Heeringa, J. G. Damoiseaux, M. J. Daemen, M. P. de Winther, M. J. Gijbels, L. Beckers, E. Lutgens and J. W. Tervaert (2005). "Leukocyte CD40L deficiency affects the CD25(+) CD4 T cell population but does not affect atherosclerosis." *Atherosclerosis* 183(2): 275-282.
277. Smyth, S. S., E. D. Reis, W. Zhang, J. T. Fallon, R. E. Gordon and B. S. Collier (2001). "Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury." *Circulation* 103(20): 2501-2507.
278. Snanoudj, R., C. Frangie, B. Derouere, H. Francois, C. Creput, S. Beaudreuil, A. Durrbach and B. Charpentier (2007). "The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept." *Biologics* 1(3): 203-213.
279. Song, H. K. and D. Y. Hwang (2017). "Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches." *Lab Anim Res* 33(2): 119-123.
280. Spence, P. J. and E. A. Green (2008). "Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(3): 973-978.
281. Stenberg, P. E., R. P. McEver, M. A. Shuman, Y. V. Jacques and D. F. Bainton (1985). "A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation." *J Cell Biol* 101(3): 880-886.

282. Stieritz, D. D. and I. A. Holder (1975). "Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description of a burned mouse model." *J Infect Dis* 131(6): 688-691.
283. Stoecklein, V. M., A. Osuka and J. A. Lederer (2012). "Trauma equals danger--damage control by the immune system." *J Leukoc Biol* 92(3): 539-551.
284. Stokes, K. Y., L. Calahan, J. M. Russell, S. Gurwara and D. N. Granger (2006). "Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitment and arteriolar dysfunction." *Microcirculation* 13(5): 377-388.
285. Stokes, K. Y. and D. N. Granger (2012). "Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction." *J Physiol* 590(5): 1023-1034.
286. Stout, R. D. and J. Suttles (1996). "The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses." *Immunol Today* 17(10): 487-492.
287. Subramaniam, M., P. S. Frenette, S. Saffaripour, R. C. Johnson, R. O. Hynes and D. D. Wagner (1996). "Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice." *Blood* 87(4): 1238-1242.
288. Sun, D. S., P. H. Ho and H. H. Chang (2016). "Soluble P-selectin rescues viper venom-induced mortality through anti-inflammatory properties and PSGL-1 pathway-mediated correction of hemostasis." *Sci Rep* 6: 35868.
289. Sun, Z., C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg and D. R. Littman (2000). "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes." *Nature* 404(6776): 402-407.
290. Suzuki, K., K. Sugimura, K. Hasegawa, K. Yoshida, A. Suzuki, K. Ishizuka, K. Ohtsuka, T. Honma, R. Narisawa and H. Asakura (2001). "Activated platelets in ulcerative colitis enhance the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes." *Scand J Gastroenterol* 36(12): 1301-1306.
291. Szymczak-Workman, A. L., C. J. Workman and D. A. Vignali (2009). "Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress." *J Immunol* 182(9): 5188-5192.
292. Taams, L. S., M. Vukmanovic-Stejic, J. Smith, P. J. Dunne, J. M. Fletcher, F. J. Plunkett, S. B. Ebeling, G. Lombardi, M. H. Rustin, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber, M. Salmon and A. N. Akbar (2002). "Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells." *Eur J Immunol* 32(6): 1621-1630.
293. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum and A. Singer (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." *Nat Immunol* 6(2): 152-162.
294. Thebault, S. and J. Ochoa-Garay (2004). "Characterization of TCR-induced phosphorylation of PKCtheta in primary murine lymphocytes." *Mol Immunol* 40(13): 931-942.
295. Thomas, M. R. and R. F. Storey (2015). "The role of platelets in inflammation." *Thromb Haemost* 114(3): 449-458.
296. Tinoco, R., F. Carrette, M. L. Barraza, D. C. Otero, J. Magana, M. W. Bosenberg, S. L. Swain and L. M. Bradley (2016). "PSGL-1 Is an Immune Checkpoint Regulator that Promotes T Cell Exhaustion." *Immunity* 44(6): 1470.
297. Tinoco, R., D. C. Otero, A. A. Takahashi and L. M. Bradley (2017). "PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape." *Trends Immunol* 38(5): 323-335.
298. Tsang, J. Y., N. O. Camara, E. Eren, H. Schneider, C. Rudd, G. Lombardi and R. Lechler (2006). "Altered proximal T cell receptor (TCR) signaling in human CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Leukoc Biol* 80(1): 145-151.
299. Tsukamoto, T. and H. C. Pape (2009). "Animal models for trauma research: what are the options?" *Shock* 31(1): 3-10.
300. Tutt, A. L., L. O'Brien, A. Hussain, G. R. Crowther, R. R. French and M. J. Glennie (2002). "T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody." *J Immunol* 168(6): 2720-2728.
301. Urzainqui, A., G. Martinez del Hoyo, A. Lamana, H. de la Fuente, O. Barreiro, I. M. Olazabal, P. Martin, M. K. Wild, D. Vestweber, R. Gonzalez-Amaro and F. Sanchez-

- Madrid (2007). "Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells." *J Immunol* 179(11): 7457-7465.
302. Urzainqui, A., J. M. Serrador, F. Viedma, M. Yanez-Mo, A. Rodriguez, A. L. Corbi, J. L. Alonso-Lebrero, A. Luque, M. Deckert, J. Vazquez and F. Sanchez-Madrid (2002). "ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1." *Immunity* 17(4): 401-412.
303. Vahl, J. C., C. Drees, K. Heger, S. Heink, J. C. Fischer, J. Nedjic, N. Ohkura, H. Morikawa, H. Poeck, S. Schallenberg, D. Riess, M. Y. Hein, T. Buch, B. Polic, A. Schonle, R. Zeiser, A. Schmitt-Graff, K. Kretschmer, L. Klein, T. Korn, S. Sakaguchi and M. Schmidt-Supprian (2014). "Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool." *Immunity* 41(5): 722-736.
304. Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud and M. Ayyoub (2010). "Human ROR γ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3⁺Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45): 19402-19407.
305. van Griensven, M., C. Krettek and H.-C. Pape (2003). "Immune Reactions after Trauma." *European Journal of Trauma* 29(4): 181-192.
306. Venet, F., A. Pachot, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape and G. Monneret (2004). "Increased percentage of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4⁺CD25⁻ lymphocytes." *Crit Care Med* 32(11): 2329-2331.
307. Venkateswarlu, R., S. G. Tamizh, M. Bhavani, A. Kumar, A. Alok, K. Karthik, N. Kalra, J. Vijayalakshmi, S. F. Paul, N. K. Chaudhury and P. Venkatachalam (2015). "Mean frequency and relative fluorescence intensity measurement of gamma-H2AX foci dose response in PBL exposed to gamma-irradiation: An inter- and intra-laboratory comparison and its relevance for radiation triage." *Cytometry A* 87(12): 1138-1146.
308. Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-532.
309. Vogel, I., B. Verbinnen, W. Maes, L. Boon, S. W. Van Gool and J. L. Ceuppens (2013). "Foxp3⁺ regulatory T cells are activated in spite of B7-CD28 and CD40-CD40L blockade." *Eur J Immunol* 43(4): 1013-1023.
310. Wang, J., H. van Dongen, H. U. Scherer, T. W. Huizinga and R. E. Toes (2008). "Suppressor activity among CD4⁺CD25⁺⁺ T cells is discriminated by membrane-bound tumor necrosis factor alpha." *Arthritis Rheum* 58(6): 1609-1618.
311. Wang, Z., A. E. Morelli, H. Hackstein, K. Kaneko and A. W. Thomson (2003). "Marked inhibition of transplant vascular sclerosis by in vivo-mobilized donor dendritic cells and anti-CD154 mAb." *Transplantation* 76(3): 562-571.
312. Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyas, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra,

- K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody and E. S. Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* 420(6915): 520-562.
313. Watz, H., D. Bock, M. Meyer, K. Schierhorn, K. Vollhardt, C. Woischwill, F. Pedersen, A. Kirsten, K. M. Beeh, W. Meyer-Sabellek, H. Magnussen and J. Beier (2013). "Inhaled pan-selectin antagonist Bimosiamose attenuates airway inflammation in COPD." *Pulm Pharmacol Ther* 26(2): 265-270.
314. Welters, I. D., G. Hafer, A. Menzebach, J. Muhling, C. Neuhauser, P. Browning and Y. Goumon (2010). "Ketamine inhibits transcription factors activator protein 1 and nuclear factor-kappaB, interleukin-8 production, as well as CD11b and CD16 expression: studies in human leukocytes and leukocytic cell lines." *Anesth Analg* 110(3): 934-941.
315. Werlen, G., E. Jacinto, Y. Xia and M. Karin (1998). "Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes." *Embo j* 17(11): 3101-3111.
316. Whiting, D. and J. A. DiNardo (2014). "TEG and ROTEM: technology and clinical applications." *Am J Hematol* 89(2): 228-232.
317. Williams, B., J. Neder, P. Cui, A. Suen, K. Tanaka, L. Zou and W. Chao (2019). "Toll-like receptors 2 and 7 mediate coagulation activation and coagulopathy in murine sepsis." *J Thromb Haemost*.
318. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* 322(5899): 271-275.
319. Winkels, H., C. Weber, E. Lutgens and N. Gerdes (2014). "Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins focus on iNKT cells and CD40/CD40L in atherosclerosis and metabolic disorders." *Curr Opin Lipidol* 25(5): 408-409.
320. Wisnoski, N., C. S. Chung, Y. Chen, X. Huang and A. Ayala (2007). "The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis." *Shock* 27(3): 251-257.
321. Wolf, D., J. D. Hohmann, A. Wiedemann, K. Bledzka, H. Blankenbach, T. Marchini, K. Gutte, K. Zeschky, N. Bassler, N. Hoppe, A. O. Rodriguez, N. Herr, I. Hilgendorf, P. Stachon, F. Willecke, D. Duerschmied, C. von zur Muhlen, D. A. Soloviev, L. Zhang, C. Bode, E. F. Plow, P. Libby, K. Peter and A. Zirlik (2011). "Binding of CD40L to Mac-1's I-domain involves the EQLKSKTL motif and mediates leukocyte recruitment and atherosclerosis--but does not affect immunity and thrombosis in mice." *Circ Res* 109(11): 1269-1279.
322. World Health Organization (2010). "Injuries and violence, the facts; Geneva: World Health Organization. accessed 20.12.2020. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44288/9789241599375_eng.pdf;jsessionid=4EE751D58C02C56486428AB5B964CB6B?sequence=1."
323. World Health Organization (2018). Global status report on road safety 2018; Geneva: World Health Organization. accessed 20.12.2020. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565684>.
324. Wu, Y., W. Li, C. Zhou, F. Lu, T. Gao, Y. Liu, J. Cao, Y. Zhang, Y. Zhang and C. Zhou (2012). "Ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced astrocytes activation by suppressing TLR4/NF-kB pathway." *Cell Physiol Biochem* 30(3): 609-617.
325. Wutzler, S., T. Lustenberger, B. Relja, M. Lehnert and I. Marzi (2013). "[Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]." *Chirurg* 84(9): 753-758.

326. Wylie, J. D., D. L. Jones, M. K. Hartley, A. L. Kapron, A. J. Krych, S. K. Aoki and T. G. Maak (2016). "Distal Femoral Osteotomy for the Valgus Knee: Medial Closing Wedge Versus Lateral Opening Wedge: A Systematic Review." *Arthroscopy* 32(10): 2141-2147.
327. Yamaguchi, T., J. B. Wing and S. Sakaguchi (2011). "Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions." *Semin Immunol* 23(6): 424-430.
328. Yang, X. O., R. Nurieva, G. J. Martinez, H. S. Kang, Y. Chung, B. P. Pappu, B. Shah, S. H. Chang, K. S. Schluns, S. S. Watowich, X. H. Feng, A. M. Jetten and C. Dong (2008). "Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs." *Immunity* 29(1): 44-56.
329. Yang, Y. and J. M. Wilson (1996). "CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40." *Science* 273(5283): 1862-1864.
330. Yu, X., K. Harden, L. C. Gonzalez, M. Francesco, E. Chiang, B. Irving, I. Tom, S. Ivelja, C. J. Refino, H. Clark, D. Eaton and J. L. Grogan (2009). "The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells." *Nat Immunol* 10(1): 48-57.
331. Zamora, C., E. Canto, J. C. Nieto, M. A. Ortiz, C. Diaz-Torne, C. Diaz-Lopez, J. M. Llobet, C. Juarez and S. Vidal (2013). "Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation." *J Leukoc Biol* 94(3): 521-529.
332. Zang, Y., S. M. Dolan, N. Ni Choileain, S. J. Kriynovich, T. J. Murphy, P. Sayles, J. A. Mannick and J. A. Lederer (2004). "Burn injury initiates a shift in superantigen-induced T cell responses and host survival." *J Immunol* 172(8): 4883-4892.
333. Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K. L. Hippen, M. Brown, B. R. Blazar, S. B. Abramson, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2010). "Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function." *Science* 328(5976): 372-376.
334. Zelenay, S. and C. Reis e Sousa (2013). "Adaptive immunity after cell death." *Trends Immunol* 34(7): 329-335.
335. Zhang, B., T. Wu, M. Chen, Y. Zhou, D. Yi and R. Guo (2013). "The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease." *Immunol Lett* 153(1-2): 58-61.
336. Zhang, G., J. Han, E. J. Welch, R. D. Ye, T. A. Voyno-Yasenetskaya, A. B. Malik, X. Du and Z. Li (2009). "Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway." *J Immunol* 182(12): 7997-8004.
337. Zhang, H., H. Kong, X. Zeng, L. Guo, X. Sun and S. He (2014). "Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy." *J Transl Med* 12: 125.
338. Zhang, Q., F. Cui, L. Fang, J. Hong, B. Zheng and J. Z. Zhang (2013). "TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway." *J Mol Cell Biol* 5(2): 85-98.
339. Zhang, R., A. Huynh, G. Whitcher, J. Chang, J. S. Maltzman and L. A. Turka (2013). "An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs." *J Clin Invest* 123(2): 580-593.
340. Zhang, X., D. N. Koldzic, L. Izikson, J. Reddy, R. F. Nazareno, S. Sakaguchi, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2004). "IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells." *Int Immunol* 16(2): 249-256.
341. Zhu, L., Z. Huang, R. Stalesen, G. K. Hansson and N. Li (2014). "Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4+ T-cell proliferation." *J Thromb Haemost* 12(7): 1156-1165.

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med Marc Hanschen, MBA für das Überlassen des Dissertationsthema und Betreuung des Dissertationsvorgangs. Sein Etablieren einer prinzipientreuen, ergebnisorientierten und konstruktiven Teamkultur in der Arbeitsgemeinschaft Polytraumaimmunologie und das Einbringen seiner sachkritischen, tiefen fachlichen Expertise ermöglichte stets das hocheffektive Durchführen der experimentellen Studien in einem innovationsfreundlichem Klima. Für das fundierte Einarbeiten in eine differenzierte wissenschaftliche Praxis und die zahlreichen wertvollen Ratschlägen auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene danke ich ihm herzlich.

Weiterhin hervorheben möchte ich PD Dr. med Jonas Pogorzelski, MHBA. Für die fundierte Einarbeitung in das Verfassen wissenschaftlicher Publikationen, sein großes Engagement in der Weichenstellung einer akademischen Karriere, sowie die zahlreichen wertvollen professionellen sowie persönlichen Mentoring-Sessions möchte ich mich herzlich bedanken.

Zudem danke ich Prof. Dr. Martijn von Griensven für die Bereitstellung der notwendigen Laborstrukturen. Herzlicher Dank gebührt auch Dr. Christian Bergmann, für das Einbringen der seiner Expertise und Bereitschaft zu fachlichem Austausch. Ebenso bin ich meinem Laborteam der experimentellen Unfallchirurgie der TUM um Marina Unger, Fritz Seidl, Laura Heimann, Sonja Jung und Sandra Schneider sowie der Arbeitsgemeinschaft Polytraumaimmunologie der TUM um PD Dr. med Hanschen, MBA, Dr. med Christian Bergmann, Alexander Ditsch, Dr. Friederike Hefele und Matthias Bock zu Dank verpflichtet. Ebenso möchte ich Andreas Kustermann MSc. und Rosi Wang für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Möglichkeit zum intellektuellen Austausch bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester ganz besonders für ihre Unterstützung, Ratschläge und das stärkende Beistehen in allen Lebenslagen bedanken.

14 Veröffentlichungen

14.1 Originalarbeiten

14.1.1 Originalarbeiten im Zusammenhang mit der Dissertation

1. **Rupp, MC**, Bergmann, CB; Bock, M; Jung, S; Biberthaler, P; Heimann, L; Hanschen, M; D; *The posttraumatic response of CD4+ regulatory T cells is modulated by direct cell-cell-contact via CD40L- and P-selectin-dependent pathways*; Central European Journal of Immunology 2021

14.1.2 Originalarbeiten unabhängig von der Dissertation

2. **Rupp, MC**; Muench, LN; Themessl A.; Ehmann, YJ; Mehl, J; Imhoff, AB; Feucht, MJ *Clinically significant improvement and high return to sports and work rates after double level osteotomy for varus malalignment*; Arthroscopy, 2021
3. **Rupp, MC**; Winkler, PW; Lutz, PM; Irger, M; Forkel, P, Imhoff, AB; Feucht, MJ; *Dislocated hinge fractures are associated with malunion after lateral closing wedge distal femoral osteotomy*; Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2021
4. **Rupp, MC**; Siebenlist, S., Scheiderer B; Imhoff, AB; Pogorzelski, J., *Indication and technique of arthroscopic stabilization for anterior shoulder instability with multidirectional laxity*; Obere Extremität, 2021
5. Ehmann YJ; Berthold, DP; Reuter, S; Beitzel, K; Köhler, R; Stöcker, F; Muench, LN; Pogorzelski, J; **Rupp, MC**; Braun, S; Imhoff, AB; Buchmann, S; *Sensorimotor deficits following shoulder surgery – significant deficits in center of pressure (COP) measurement in patients with confirmed successful outcomes*; Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2021
6. Muench, LN; Kriscenski D; Tamburini L; Berthold, DP; **Rupp, MC**; Mancini MR; Cote MP; McCarthy MB; Mazzocca AD *The Effect of Magnesium on Cellular Adhesion and Proliferation of Human Subacromial Bursal Tissue, Osteoblasts, and Tenocytes on Suture Tape Used in Rotator Cuff Surgery*; ASMAR
7. Themessl, A; Mayr, F; Hatter, K; **Rupp, MC**; Imhoff, AB; Pogorzelski, J; Buchmann, S; *Return to Sports and Return to Work after Septic Arthritis following Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2021
8. Imhoff, AB; Bartsch, E; Becher, C; Behrens, P; Bode, G; Cotic, M; Diermeier, T; Falk, H; Feucht, MJ; Haupt, U; Hinterwimmer, S; Holz, J; Hutter, R; Kaiser, R; Knoblauch, T; Nebelung, W; Niemeyer, P; O'Donnel, T; Pagenstert, G; Patzer, T; Rose, T; **Rupp, MC**; Tischer, T; Venjakob, AJ; Vogt, S; Pogorzelski, J. *The Lack of Retropatellar Resurfacing at Index Surgery is Significantly Associated With Failure in Patients Following Patellofemoral Inlay Arthroplasty – A multi-center study of more than 260 patients*; Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc

9. Winkler, PW; Lutz, PM; **Rupp MC**; Imhoff, FB; Izadpanah, K; Imhoff, AB; Feucht, MJ. *Increased external tibial torsion is an infratuberositary deformity and is not correlated with a lateralized position of the tibial tuberosity.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020.
10. Winkler, PW; **Rupp, MC**; Lutz, PM; Geyer, S; Forkel, P; Imhoff, AB; Feucht MJ: *A hinge position distal to the adductor tubercle minimizes the risk of hinge fractures in lateral open wedge distal femoral osteotomy.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020.
11. Pogorzelski, J; **Rupp, MC**; Imhoff, AB; Lutz, PM; Cotic, M; Beeck, S; Ketzer, C; Feucht, MJ: *Reliable improvements in participation in low-impact sports following implantation of a patellofemoral inlay arthroplasty at mid-term follow-up.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020.
12. Pogorzelski, J, Erber, B; Themessl, A; **Rupp, M-C**, Feucht, MJ; Imhoff, AB; Degenhardt, H.; Irger, M: *Definition of the Terms “Acute” And “Traumatic” in Rotator Cuff Injuries: A Systematic Review and Call for Standardization in Nomenclature.* Arch Orthop Trauma Surg, 2020.
13. Lutz PM, Winkler PW, **Rupp MC**, Geyer S, Imhoff AB, Feucht MJ: *Complex patellofemoral reconstruction leads to improved physical and sexual activity in female patients suffering from chronic patellofemoral instability, Complex patellofemoral reconstruction leads to improved physical and sexual activity in female patients suffering from chronic patellofemoral instability.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020.
14. Feucht MJ, Lutz PM, Ketzer C, **Rupp MC**, Cotic M, Imhoff AB, Pogorzelski J.: *Preoperative patellofemoral anatomy affects failure rate after isolated patellofemoral inlay arthroplasty.* Arch Orthop Trauma Surg, 2020.

14.2 Abstracts / Kongressbeiträge

14.2.1 Abstracts / Kongressbeiträge im Zusammenhang mit der Dissertation

1. **Rupp, MC**; Bergmann, CB; Bock, M; Jung, S; Huber-Wagner, S; Biberthaler, P; van Griensven, M; Hanschen, M. *Do CD40L and P-Selectin (CD62P) dependent pathways modulate the response of CD4+ T-Regulatory cells following trauma?* Shock 47:123; 40. Tagung der Shock Society; Fort Lauderdale, Miami, USA
2. **Rupp, MC**; Bergmann, CB; Bock, M; Jung, S; Huber-Wagner, S; Biberthaler, P; van Griensven, M; Hanschen, M. *Der Einfluss CD40L- und P-Selektin-abhängiger Signalwege auf die Aktivierung von CD4+ regulatorischen T-Zellen nach Trauma.* Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2018); 20181023-20181026; Berlin; DOCGF19-681 /20181106/
3. **Rupp, MC**; Bergmann, CB; Bock, M; Jung, S; Huber-Wagner, S; Biberthaler, P; van Griensven, M; Hanschen, M. *Direct Cell-Cell contact via P-Selectin (CD62P) and CD40L dependent pathways influences the posttraumatic response of CD4+ T-Regulatory Cells.* Chirurgische Forschungstage (2018); Erlangen

14.2.2 Abstracts / Kongressbeiträge unabhängig von der Dissertation

4. **Rupp, MC**; Winkler, PW; Lutz, PM; Irgler, M; Forkel, P, Imhoff, AB; Feucht, MJ; *Dislozierte Hinge-Frakturen prädisponieren für delayed und non-union nach lateral schließender distaler femoraler Osteotomie*; AGA-Kongress (2021); Innsbruck
5. **Rupp, MC**; Themessl, A; Ehmann, Y; Imhoff, AB; Feucht, MJ, *Klinisches Outcome und Return to Sports nach Doppelstockosteotomie bei varischer Beinachse*; AGA-Kongress (2021); Innsbruck
6. **Rupp, MC**; Winkler, PW; Lutz, PM; Irgler, M; Forkel, P, Imhoff, AB; Feucht, MJ; *Klassifikation von Hinge-Frakturen nach lateral schließender distaler femoraler Osteotomie*; Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2021)
7. **Rupp, MC**; Degenhardt, H; Obmann, S; Scheiderer, B; Ketzer, C; Feucht, MJ; Imhoff, AB; Pogorzelski, J; *The Influence of the Morphology of the Acromio-Clavicular Joint on the Postoperative Outcome Following Acute Stabilization - A Case Series of 81 Patients*; ISAKOS Kongress (2021)
8. **Rupp, MC**; Themessl, A; Ehmann, Y; Imhoff, AB; Feucht, MJ, *Clinical outcome and return to sports and work after double level osteotomy for varus malalignment*; ISAKOS Kongress (2021)
9. **Rupp, MC**; Degenhardt, H; Obmann, S; Scheiderer, B; Ketzer, C; Feucht, MJ; Imhoff, AB; Pogorzelski, J; *The Influence of the Morphology of the Acromio-Clavicular Joint on*

- the Postoperative Outcome Following Acute Stabilization - A Case Series of 81 Patients;*
ISAKOS Kongress (2021)
10. **Rupp, MC**; Degenhardt, H; Obmann, S; Scheiderer, B; Ketzer, C; Feucht, MJ; Imhoff, AB; Pogorzelski, J; *Einfluss der Morphologie des Akromioklavikular(AC)-Gelenks auf das postoperative Ergebnis nach akuter Stabilisierung - eine Fallserie von 81 Patienten;* Deutsche Vereinigung für Schulter und Ellenbogenchirurgie (DVSE) Science Days (2021)
11. N. Wilhelm; F. J. Lindner; M. J. Feucht; J. Pogorzelski; J. Neumann, A. S. Gersing, M. R. Makowski, K. Woertler, S. Haddadin, R. Burgkart, A. B. Imhoff, N. Wilhelm, v. Schacky C. E; **MC Rupp**. *Development and Validation of a Deep Learning Algorithm for Automated Comprehensive Leg Alignment Analysis;* Deutsche Kniegesellschaft Kongress (2021)