



Fakultät für Medizin

Klinikum rechts der Isar

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

Experimentelle Unfallchirurgie

**Thrombozyten modulieren die Immunantwort
nach Trauma durch die Interaktion mit
CD4+ regulatorischen T-Zellen (CD4+ Tregs)
in einem Mausmodell**

Christian Benjamin Bergmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Joner

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Marc Hanschen

2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

3. apl. Prof. Dr. Dr. Martijn van Griensven

Die Dissertation wurde am 14.09.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 20.02.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung.....	8
2 Abkürzungsverzeichnis	12
3 Einleitung.....	14
3.1 Die Bedeutung der Traumaimmunologie bei Patienten nach Polytrauma	14
3.1.1 Sterbeziffern und Todesursachen	14
3.1.2 SIRS, CARS und MODS	14
3.1.3 Konsequenzen für die Forschung?	16
3.2 Die Rolle der regulatorischen CD4+ T-Zellen (CD4+ Tregs) im Immunsystem	17
3.2.1 Historischer Überblick CD4+ Tregs	17
3.2.2 Immunsuppression durch CD4+ Tregs.....	19
3.2.3 Die Regulation der CD4+ Tregs.....	22
3.2.4 Konsequenzen für die Forschung?	24
3.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase und dem Immunsystem	24
3.3.1 Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase	24
3.3.2 Die immunologische Rolle der Thrombozyten: Immunothrombose.....	25
3.3.3 Die Rolle der Thrombozyten nach Trauma.....	28
3.3.4 Konsequenzen für die Forschung?	30
4 Forschungsfragen	31
A: Werden CD4+ Tregs posttraumatisch schneller aktiviert als CD4+ non-Tregs?.....	31
B: Modulieren Thrombozyten die frühe posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?.....	31
C: Modulieren Thrombozyten die späte posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?	31
D: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten?	31
E: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Hämostase?.....	31
5 Material und Methoden	32
5.1 Puffer und Chemikalien.....	32
5.2 Antikörper	33
5.3 Geräte und dazugehörige Reagenzien	36
5.4 Medikamente	36
5.5 Tiere.....	37

5.6	Depletionsmodell	39
5.6.1	Depletion Thrombozyten und Isotypkontrolle	39
5.6.2	Depletion CD4+ Tregs und Isotypkontrolle	39
5.7	Verbrennungsmodell	40
5.7.1	Narkose und Analgesie	40
5.7.2	Präparation der Versuchstiere	40
5.7.3	Verbrennung	41
5.7.4	Scheinintervention	43
5.7.5	Euthanasie	43
5.8	Zellgewinnung	43
5.8.1	Chirurgische Technik	44
5.8.2	Zellisolierung	44
5.9	Blutgewinnung	44
5.9.1	Entnahmetechnik	45
5.10	Durchflusszytometrie	45
5.10.1	Durchflusszytometrie und Phospho-Durchflusszytometrie	45
5.10.2	Färbung der CD4+ non-Tregs/ CD4+ Tregs und der Aktivierungsparameter	45
5.10.3	Gating Strategie CD4+ Tregs	46
5.10.4	Aktivierung von CD4+ Tregs mittels CD3ε	48
5.10.5	AK-Färbung der Thrombozyten und Aktivierungsparameter	48
5.10.6	Gating Strategie Thrombozyten	48
5.10.7	Aktivierung von Thrombozyten mittels Thrombin	49
5.11	Thromboelastometrie	50
5.11.1	Funktionsprinzip Thromboelastometrie	50
5.11.2	Durchführung Thromboelastometrie mit ROTEM® delta und Cup&Pin mini®	50
5.12	Versuchsaufbau	51
5.12.1	A: Werden CD4+ Tregs posttraumatisch schneller aktiviert als CD4+ non-Tregs? Versuchsgruppen und Versuchsablauf	51
5.12.2	B: Modulieren Thrombozyten die frühe posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs? Versuchsgruppen und Versuchsablauf	52
5.12.3	C: Modulieren Thrombozyten die späte posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs? Versuchsgruppen und Versuchsablauf	54

5.12.4	D: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten? Versuchsgruppen und Versuchsablauf.....	56
5.12.5	E: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Hämostase? Versuchsgruppen und Versuchsablauf	59
5.13	Statistik.....	59
6	Ergebnisse.....	60
6.1	Nachweis der Funktionalität der Methoden:.....	60
6.1.1	Antikörper-Depletion der Thrombozyten	60
6.1.2	Positivkontrolle Aktivierungsparameter Thrombozyten: Aktivierung mittels Thrombin....	61
6.1.3	Antikörper-Depletion CD4+ Tregs	62
6.1.4	Positivkontrolle Aktivierungsparameter CD4+ Tregs: Aktivierung mittels CD3ε	63
6.2	A: Trauma führt zu einer Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ non-Tregs, in der frühen Phase nach Trauma	65
6.3	B: Thrombozytendepletion führt zu einer verminderten Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen Phase nach Trauma	68
6.4	C: Thrombozytendepletion führt zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in der späten Phase nach Trauma	70
6.5	D: CD4+ Tregs beeinflussen nicht die Expression von Aktivierungsparametern der Thrombozyten 72	
6.6	E: CD4+ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase in der frühen Phase nach Trauma	73
7	Diskussion.....	76
7.1	Diskussion der Methodik.....	76
7.1.1	Tiere.....	76
7.1.2	Depletionsmodell	76
7.1.3	Narkose.....	79
7.1.4	Verbrennungsmodell.....	79
7.1.5	Identifikation der CD4+ Tregs.....	80
7.1.6	CD4+ Tregs: Wahl der Aktivierungsparameter.....	80
7.1.7	Wahl der Beobachtungszeiträume.....	82
7.1.8	Thrombozyten: Wahl der Aktivierungsparameter	83
7.1.9	Thromboelastometrie	84
7.2	A: Trauma führt zu früher Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ non-Tregs (T- Effektor-Zellen).....	85

7.2.1	Relevanz T-Zell-Rezeptor-abhängiger CD4+ Treg Aktivierung.....	85
7.2.2	Limitationen.....	86
7.2.3	Schlussfolgerung A	87
7.3	B: Thrombozyten augmentieren die Aktivität von CD4+ Tregs in der frühen Phase nach Trauma 87	
7.3.1	Neuer Regulationsmechanismus.....	87
7.3.2	Unterschiede der thrombozytären Stimulusantwort, sowie Limitationen	88
7.3.3	Schlussfolgerung B.....	89
7.4	C: Thrombozytendepletion führt zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in einer späten Phase nach Trauma	89
7.4.1	Begründung der Notwendigkeit der schnellen Funktion der CD4+ Tregs.....	89
7.4.2	Limitationen.....	90
7.4.3	Schlussfolgerung C.....	91
7.5	D: CD4+ Tregs beeinflussen nicht die Expression von Aktivierungs-parametern der Thrombozyten 91	
7.5.1	Keine Veränderung bei P-Selektin, CD63 und TLR-9: Divergenz der Expression und Hämostase?	91
7.5.2	Limitationen.....	92
7.5.3	Schlussfolgerung D	92
7.6	E: CD4+ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase in der frühen Phase nach Trauma	92
7.6.1	Hyperkoagulation nach Verbrennungstrauma im humanen und murinen Setting	92
7.6.2	Unterschiede in der hämostatischen Funktion der Thrombozyten nach CD4+ Treg-Depletion nach 2h	93
7.6.3	Keine Änderung der hämostatischen Funktion der Thrombozyten nach CD4+ Treg-Depletion nach 7d	93
7.6.4	Limitationen.....	94
7.6.5	Schlussfolgerung E.....	94
8	Schlussfolgerung.....	95
8.1	Relevante Erkenntnisse aus dieser Arbeit: Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten die Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen post-traumatischen Phase positiv beeinflussen. Dieser Effekt ist reziprok.....	95
8.2	Notwendige zu bearbeitende anschließende Fragestellungen: Mechanismen der Interaktion.	95
8.3	Ausblick in die Klinik: Diagnostische und therapeutische Möglichkeiten	95

9	Literaturverzeichnis.....	96
10	Danksagungen.....	107
11	Publikationsverzeichnis.....	108

1 Zusammenfassung

Thrombozyten modulieren die Immunantwort nach Trauma durch Interaktion mit CD4+ regulatorischen T-Zellen in einem Mausmodell

Einleitung: Verletzungen stellen weltweit die führende Todesursache für Menschen unter 45 Jahren dar. Traumapatienten stellen in der klinischen Versorgung eine Herausforderung dar, da 90% innerhalb der ersten Woche ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) entwickeln. CD4+ regulatorische T-Zellen (CD4+ Tregs) sind wesentlich an dem kompensatorischen anti-inflammatorischen Response-Syndrom, dem CARS, beteiligt. Die immunsuppressive Rolle der CD4+ Tregs wird posttraumatisch als protektiv angesehen. Die Mechanismen der CD4+ Treg Aktivierung in dem Setting sind jedoch weitestgehend unbekannt. Wir postulieren eine potentielle Rolle von Thrombozyten bei der Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma.

Forschungsfragen: Es wurde zunächst der Forschungsfrage nachgegangen, ob CD4+ Tregs posttraumatisch schneller aktiviert werden als CD4+ non-Tregs. Anschließend untersuchten wir, ob Thrombozyten die frühe posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs nach 2 Stunden modulieren, oder die späte posttraumatische Immunantwort dieser Zellen nach 7 Tagen. Um eine potenzielle reziproke Aktivierung von CD4+ Tregs und Thrombozyten zu untersuchen, schloss sich die Frage an, ob CD4+ Tregs die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten nach 2 Stunden oder 7 Tagen modulieren. Ergänzend zur Aktivität wurde auch untersucht, ob CD4+ Tregs die posttraumatische Hämostase beeinflussen.

Material und Methoden: Das murine Verbrennungsmodell (drittgradige Verbrennung von 25% der Körperoberfläche von männlichen C57Bl/6N Mäuse, n=6-9) wurde zur Induktion des Traumas verwendet, entsprechende sham-Behandlungen wurden durchgeführt. Um die Rolle von Thrombozyten auf die CD4+ Tregs Aktivierung zu untersuchen, wurden vor der Intervention entweder Thrombozyten depletiert, oder die Versuchstiere in die Kontrollgruppe randomisiert. Um die Rolle von CD4+ Tregs auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen, wurde vor der Intervention eine CD4+ Treg Depletion vorgenommen. Auch hier wurden Experimente mit Kontrollgruppen durchgeführt. Die drainierenden Lymphknoten, Blut und die Milz wurden 2 Stunden und 7 Tage nach dem Trauma entnommen. Die CD4+ Treg Aktivität wurde mittels Phospho- und konventioneller Durchflusszytometrie gemessen. Die Thrombozytenaktivität wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Effekte auf die Hämostase wurden mittels Thromboelastometrie (ROTEM) erfasst.

Ergebnisse: Das Verbrennungstrauma führt in der frühen posttraumatischen Phase zu einer selektiven Aktivierung der CD4+ Tregs, nicht jedoch der CD4+ non-Tregs. Nach dem Verbrennungstrauma augmentieren Thrombozyten die Aktivität der CD4+ Tregs. Dieser Effekt konnte nur in der frühen posttraumatischen Phase nach 2 Stunden beobachtet werden, nicht jedoch nach 7 Tagen. Die vorhergehende Depletion der CD4+ Tregs führt zu keiner Änderung der Aktivierungsparameter der Thrombozyten. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass CD4+ Tregs die Hämostase in der frühen posttraumatischen Phase beeinflussen.

Diskussion: Thrombozyten sind in der Lage die körpereigene Immunantwort nach Trauma durch die Verstärkung der Aktivierung von CD4+ Tregs zu modulieren. Die Aktivierung von CD4+ Tregs wird im Allgemeinen als protektiv angesehen. Dies unterstreicht die Hypothese, dass Thrombozyten als Wächter des Immunsystems fungieren und sofort nach Traumata immunologische Reaktionen modulieren. Interessanterweise sind CD4+ Tregs vice versa in der Lage die hämostatische Funktion von Thrombozyten zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Thrombozyten die frühe posttraumatische protektive Aktivität von CD4+ Tregs verstärken und dieser Effekt reziprok ist. Diese Erkenntnis trägt dazu bei, die Diagnostik und Therapie der immunologischen Perturbation nach Trauma zu verbessern.

Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model

Introduction: Injury is the leading cause of death worldwide for humans below the age of 45. Traumatized patients are a challenge in clinical treatment because 90% develop a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) within the first week. CD4+ regulatory T cells (CD4+ Tregs) are a relevant part of the compensatory anti-inflammatory response syndrome, the CARS. The immunosuppressive role of CD4+Tregs following trauma induced injury is considered protective. The mechanisms of CD4+ Treg activation in this setting are mostly unknown. We postulate a potential role of platelets in the posttraumatic activation of CD4+ Tregs.

Research questions: First, we raised the question whether differences in the activation of CD4+ Tregs and CD4+ non-Tregs can be detected following trauma. Second, we questioned whether platelets modulate the early immune response of CD4+ Tregs 2 hours following trauma or the late immune response 7 days following trauma. Finally, we asked whether reciprocal activation takes place and investigated whether CD4+ Tregs modulate the posttraumatic activation of platelets 2 hours or 7 days following trauma. In addition to the activation of platelets we examined whether CD4+ Tregs influence the posttraumatic hemostasis.

Material and methods: We employed the murine burn injury model (third degree burn of 25% of the total body surface) using male C57Bl/6N mice (n=6-9), corresponding sham controls were conducted. To analyze the role of platelets in CD4+ Treg activation, platelets were depleted prior to trauma induction. In an additional set of experiments, the role of CD4+ Tregs on platelet activation was analyzed by depleting CD4+ Tregs prior to onset of injury. For each set of experiments, controls were conducted accordingly. The draining lymph nodes, blood and the spleen were harvested 2 hours and 7 days after trauma. CD4+ Treg activation was measured using phospho- and conventional flow cytometry. Platelet activation was measured by flow cytometry. Effects on hemostasis were measured via thromboelastometry (ROTEM).

Results: Trauma induced injury leads to early activation of CD4+ Tregs, but not of CD4+ non-Tregs. Following burn injury, platelets augment the activation of CD4+ Tregs. This effect was only observed early following trauma (2 hours), but not late (7 days). Depletion of CD4+ Tregs prior to the onset of trauma induced injury does not change the activation parameters of platelets following injury.

Discussion: Platelets are able to modulate the immune response following trauma induced injury by augmenting the activation of CD4+ Tregs. The activation of CD4+ Tregs is considered protective in the setting of trauma induced injury. This underlines the hypothesis that platelets act as sentinels of the immune system and modulate immunologic reactions immediately after trauma. Interestingly, CD4+ Tregs

are vice versa able to influence the hemostatic function of platelets. This work is the first to show, that platelets augment the protective activity of CD4+ Tregs and that the interaction of platelets and CD4+ Tregs is reciprocal. These findings contribute to improve the diagnostics and therapy of the immunologic perturbation following trauma induced injury.

2 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATP	Adenosintriphosphat
CARS	Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CD	Cluster of Differentiation
CFT	Clot Formation Time
CLP	Cecal ligation and puncture
CT	Clotting Time
CXCL4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DEREG	Depletion von Regulatorischen T Zellen
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DZ	Dendritische Zellen
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxP3	Forkhead-Box Protein 3
FSC	Forward Scatter
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GP	Glykoprotein
GRO	Growth regulated protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype
i.p.	intraperitoneal
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICOS	Inducible T-cell COStimulator
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
MCF	Maximum Clot Firmness
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Major histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
NETs	Neutrophil extracellular traps

PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBA	4-Phenylbutyric acid
PBS	Phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PF	Plättchen Faktor
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL	P-selectin glycoprotein ligand
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment Score
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute („RPMI“)
s.c.	subcutan
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SSC	Side Scatter
SYK	Enzym aus der Gruppe der Tyrosinkinasen.
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming growth factor
Th3 cells	T helper 3 cells
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R II	Tumor necrosis factor receptor 2
Tr1 T cells	T regulatory type 1 cells
TRALI	Transfusion related acute lung injury
Tregs	Regulatorische T Zellen
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wild type
ZAP	Zeta-chain-associated protein kinase
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Einleitung

3.1 Die Bedeutung der Traumaimmunologie bei Patienten nach Polytrauma

3.1.1 Sterbeziffern und Todesursachen

Verletzungen stellen weltweit die führende Todesursache für Menschen unter 45 Jahren dar [1]. Sie sind ursächlich für etwa 9% der weltweiten Todesfälle. Damit sterben jährlich mehr Menschen an Verletzungen, als an HIV, Tuberkulose und Malaria zusammengenommen [2]. Betreffen Verletzungen mehr als eine Körperregion und ist eine oder die Kombination mehrerer Verletzungen lebensbedrohlich, so spricht man von einem Polytrauma [3]. Aufgrund der Komplexität stellt das Polytrauma für die klinische Versorgung eine Herausforderung dar. Dem Verlust an Lebensjahren der meist jungen Patienten nach Polytrauma wird der aktuelle finanzielle und wissenschaftliche Aufwand in Deutschland bisher nicht gerecht. Die Intensivierung der Grundlagenforschung ist deswegen dringend erforderlich um Diagnostik und Therapie nachhaltig zu verbessern.

3.1.2 SIRS, CARS und MODS

Traumata haben Weichteilschäden, Organschäden, Gewebehypoxie, Frakturen, Hämorrhagien, Infektionen [4, 5] und oft auch Schäden des Zentralen Nervensystems als Folge. Aufgrund dieser Schäden wird das Immunsystem aktiviert. Innerhalb der ersten Woche entwickeln Patienten nach Polytrauma in über 90% der Fälle eine systemische Immunreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome = SIRS) [6]. Die Aktivierung des Immunsystems im Rahmen des SIRS geht einher mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- α , IL-6 und IL-1 β [7]. Diese aktivieren die Zellen des Immunsystems para- und/oder autokrin und können als Biomarker für die Schwere der Verletzung genutzt werden. Allerdings ist die Validität verschiedener Biomarker für die Prognose bei hyperinflammatorischen Patienten nach Polytrauma bis heute nicht ausreichend geklärt [8]. Gemeinhin gelten die Interleukine IL-6 und IL-10 und besonders deren Ratio als geeignete Marker für eine Prognose, insbesondere im Hinblick auf das Auftreten des MODS (Multi organ dysfunction syndrome, dt. Multiorgandysfunktions-Syndrom) [9]. Die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine führt zu einer Veränderung der zellulären Kompartimente und zur Permeabilisierung des Endothels [6, 10]. In der primären Phase spielen die Zellen des unspezifischen Immunsystems, insbesondere Monozyten und die schnell aktivierbaren neutrophilen Granulozyten, eine wesentliche Rolle in der Pathogenabwehr. Insbesondere die neutrophilen Granulozyten werden in der frühen posttraumatischen Phase aktiviert [4]. Neben der Aktivierung von Granulozyten werden auch die Zellen des spezifischen Immunsystems aktiviert. Pathogene endogene Partikel wie mitochondriale DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), zusammen mit den

inflammatorischen Zytokinen IL-6, TNF- α , High-mobility Group Box Protein 1 (HMGB1), IL-33 und Interleukin 1- α , aktivieren Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen [7, 11, 12]. Die endogenen DAMPs ähneln strukturell den exogenen PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) [11]. Zweitens gelangen über exogene Pathogene in die Blutbahn oder das Gewebe. DAMPs und PAMPs aktivieren antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen und vor allem die dendritischen Zellen. Diese präsentieren mittels der MHC II Moleküle den T-Zellen Antigene. T-Zellen werden dadurch aktiviert und halten die Immunreaktion aufrecht [4, 13]. Die Aktivierung des Immunsystems nach Trauma durch DAMPs wird in der Literatur als etabliertes Konzept diskutiert, unklar verbleibt ob die Aktivierung des Immunsystems einer Antigen-abhängigen Aktivierung unterliegt. Da nach Trauma nicht zwingend ein Infektionsherd vorliegt, verbleibt aktuell unklar ob eine Alloantigen-abhängige oder -unabhängige Aktivierung des Immunsystems vorliegt.

Das SIRS wird per definitionem als eine „sterile“ oder endogene Inflammation angesehen. Nach der mittlerweile überholten Definition der Sepsis, wird diese als das Vorliegen eines SIRS mit einem zusätzlichen Infektionsherd charakterisiert. In der neuesten Sepsis Definition (The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)) vom Februar 2016 wurde von dieser Definition Abstand genommen. Nunmehr wurde die Organdysfunktionen in Kombination mit einer Infektion als Kriterium für die Sepsisdefinition beschlossen [14]. Mittels des SOFA Score (Sequential Organ Failure Assessment Score), oder des vereinfachten qSOFA Score (quick SOFA Score), wird die Dysfunktion von Organen beschrieben. In den SOFA Score fließen respiratorische, koagulatorische, hepatische, kardiovaskuläre, cerebrale und renale Funktionsstörungen ein. Inwiefern sich SIRS und Sepsis unterscheiden und vor allem welche klinischen Konsequenzen daraus abzuleiten sind, ist noch nicht ausreichend geklärt [15].

Im Rahmen des SIRS wird das Gewebe im hyperinflammatorischen Zustand auf der Ebene der Mikrozirkulation geschädigt, zumeist durch unzureichende Sauerstoffversorgung sowie durch die Entstehung von Sauerstoffradikalen, die enzymatisch nicht ausreichend neutralisiert werden können [16]. Kapillarschäden und Ödeme werden beobachtet. Die Gerinnung wird bis zur Entwicklung einer Dissemination (Disseminated Intravascular Coagulation = DIC) gestört [17, 18]. Die überschießende Immunreaktion in Kombination mit einer beeinträchtigten Hämostase führen in über 50% der Fälle bei Intensivpatienten nach Polytrauma zu einem singulären Organversagen oder dem MODS [19, 20].

Der Körper versucht diesen Mechanismen entgegen zu wirken. Kompensatorisch wird daher die Aktivität des Immunsystems gehemmt. Bone und Mitarbeiter beschrieben diesen Umstand 1996 erstmals mit dem

Begriff des Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) [21]. In der Vergangenheit war man der Annahme, dass das CARS als Folge des SIRS auftritt um die Folgen der Hyperinflammation einzudämmen. Diese Sicht hat sich heute gewandelt. Nach jetzigen Erkenntnissen geht man davon aus, dass die hyperinflammatorische Reaktion (SIRS) gleichzeitig mit der hypoinflammatorischen Reaktion (CARS) auftritt [22]. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die posttraumatische Immunsuppression maßgeblich von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (CD4+ Tregs) beeinflusst wird [23]. Es ist daher anzunehmen, dass CD4+ Tregs wesentlich an der Ausbildung des CARS beteiligt sind. CD4+ Tregs tragen auf verschiedene Arten zur Immunsuppression bei. Die genauen Mechanismen sind im Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Bis heute gibt es - im Gegensatz zum SIRS - keine klinisch oder laborchemisch definierten Kriterien, die das CARS beschreiben würden. Es gibt jedoch Versuche wesentliche Elemente zu definieren, die für die Immunsuppression im Rahmen von CARS typisch sind. So werden unter anderem die Reduktion von Lymphozyten durch Apoptose, die herabgesetzte Reagibilität von Monozyten nach Stimulation durch Zytokine, sowie die gesteigerte Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 genannt [24, 25]. Ein wesentlicher Produzent von IL-10 sind CD4+ Tregs [26]. In verschiedenen Mausmodellen konnte nach Inflammation eine ausgeprägte Expansion und Aktivierung von CD4+ Tregs gemessen werden, wie zum Beispiel im Modell nach coecaler Ligation und Punction (cecal ligation and puncture = CLP) [27, 28] sowie in anderen Sepsismodellen [29]. In verschiedenen Studien wurde der Effekt von CD4+ Tregs auf das Outcome nach Inflammation untersucht. In einem CLP Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass ein Transfer aktivierter CD4+ Tregs zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens führte [30]. Generell wird die immunsuppressive Rolle der CD4+ Tregs als protektiv angesehen [23, 25, 31], wobei dieser Standpunkt auch umstritten ist [25]. Einigkeit besteht in der Ansicht, dass eine überschießende Immunsuppression letal enden kann [22, 31].

3.1.3 Konsequenzen für die Forschung?

Bis heute ist nicht ausreichend geklärt, welche Mechanismen der oben beschriebenen posttraumatischen Perturbation des Immunsystems und der posttraumatischen Gerinnungsstörung zu einem Multiorganversagen führen. Während klinischen Komplikationen wie Blutverlust, Hypoxie, Frakturen, mechanischen Organschäden und Weichteilschäden therapeutisch immer besser begegnet werden kann, fehlt gegenwärtig ein ausreichendes Verständnis über die immunologischen posttraumatischen Regulierungsmechanismen. Es ist nach wie vor unzureichend erforscht, wie die immunsuppressive Reaktion selbst reguliert wird und inwieweit sie protektiv wirkt.

3.2 Die Rolle der regulatorischen CD4+ T-Zellen (CD4+ Tregs) im Immunsystem

3.2.1 Historischer Überblick CD4+ Tregs

Bereits in den 70er und 80er Jahren wurden Zellen entdeckt, die immunsuppressive Wirkung zeigten [32]. Das Interesse an breiter Forschung im Bereich der regulatorischen Zellen wuchs jedoch erst ab dem Jahr 1995 wesentlich. Ein Durchbruch war die Beschreibung suppressiver Immunzellen von Sakaguchi und Mitarbeitern [33]. Er beschrieb das Vorkommen von CD4+ T-Zellen, die in hohem Maße den Interleukin-2-Rezeptor exprimieren. Es wurde erstmals beschrieben, dass dieser Zelltyp in der Lage war Autoimmunprozesse einzudämmen und damit wesentlich zur Immunhomöostase beizutragen [33]. Die hohe Expression von CD25, der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (IL2-R α), zusammen mit CD4 wurde zur Identifikation der CD4+ regulatorischen T-Zellen verwendet. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Expression von CD25 für CD4+ Tregs nicht rein spezifisch ist [34, 35]. Neben CD4+ Tregs exprimieren transient unter anderem auch T-Effektor-Zellen CD25. Es stellte sich daher die Frage, welche Zellen eindeutig regulatorischer Natur sind und ob es neben CD25 einen spezifischeren Marker für diese gibt. Eine der wesentlichsten Entdeckungen für die Beschreibung und Erforschung der CD4+ Tregs stellt die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein-P3 (FoxP3) dar. Gleich mehrere Arbeitsgruppen erkannten im Jahr 2003, dass FoxP3 sowohl für die Entwicklung als auch die Funktion von CD4+ Tregs wesentlich ist [36-38]. Besonders prominent war die Erfahrung, dass Mutationen in FoxP3 in humanen Patienten zu der schweren Autoimmunerkrankung IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) führt, da die Immunhomöostase nicht mehr gewährleistet werden kann [39]. Eine chronologische Übersicht über die Geschichte der Entdeckung der regulatorischen T-Zellen ist in der folgenden Abbildung 1 dargestellt.

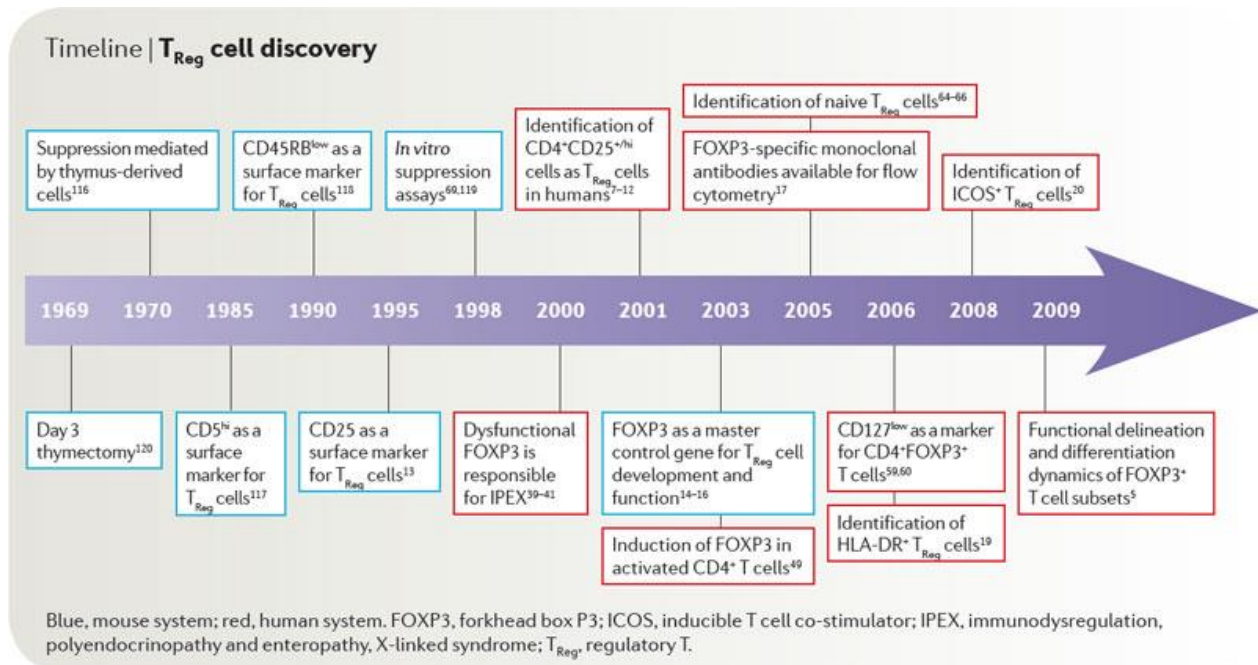


Abbildung 1: Die Entdeckung der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs) und deren Funktionen im Zeitverlauf. (Abbildung aus [32]) Die Abbildung zeigt die chronologische Entdeckung der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ Tregs), ihrer Oberflächenmarker und deren Funktion. (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Immunology, S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler, "FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system," Nat Rev Immunol, vol. 10, no. 7, pp. 490-500, Jul, 2010©)

Heutzutage gehen die meisten Autoren von einer wesentlichen Rolle der CD4⁺ Tregs für die Immunhomöostase aus [32, 40, 41]. Welche Rolle dieser Zelltyp klinisch spielt ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde bald nach der Entdeckung von FoxP3 herausgefunden, dass es eine Reihe von unterschiedlichen Subtypen innerhalb der CD4⁺ Treg Familie gibt. Neben CD4⁺ Tregs gibt es weitere Populationen regulatorischer Zellen, darunter CD8⁺ Tregs, CD4⁺ Treg-Gedächtnis-Zellen und sogar regulatorische B-Zellen [42]. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass auch innerhalb der CD4⁺ Tregs unterschieden werden muss. Eine grundlegende Unterscheidung wird zwischen den im Thymus gebildeten CD4⁺ tTregs und den in der Peripherie aus naiven T-Zellen induzierbaren CD4⁺ pTregs getroffen. CD4⁺ tTregs, auch natürliche CD4⁺ Tregs genannt (naturalTregs = nTregs), werden im Thymus gebildet und in die Blutbahn freigesetzt [43]. CD4⁺ pTregs, auch induzierte CD4⁺ Tregs genannt (inducibleTregs = iTregs), gelangen als naive T-Zellen in den Kreislauf oder das periphere Gewebe und wandeln sich dort nach dem Kontakt mit bestimmten dendritischen Zellen um. Die genauen Mechanismen müssen noch untersucht werden [44]. CD4⁺ pTregs können darüber hinaus nochmals unterschieden werden. So gibt es innerhalb dieser induzierbaren CD4⁺ Tregs zum einen IL-10 produzierende Tr1 CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺ T regulatory type 1 cells), zum anderen hauptsächlich TGF-β produzierende Th3 CD4⁺ T-Zellen

(T helper 3 cells) und drittens meist über Zell-Zell-Kontakt wirkende CD4+CD25+Tregs [45, 46]. Die Nomenklatur ist hier keineswegs einheitlich und die Unterscheidung der Subtypen Gegenstand aktueller Forschung [47].

3.2.2 Immunsuppression durch CD4+ Tregs

Das Immunsystem des Menschen ist auf eine feine Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Systemen angewiesen. Dieses Zusammenspiel soll zum einen gewährleisten, dass pathogene Einflüsse effektiv bekämpft werden und zum anderen verhindern, dass Immunzellen körpereigene Zellen als fremd erkennen und angreifen. Zu letzterem trägt in wesentlichem Maße bei, dass bei T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus die Apoptose induziert wird, sollten sie körpereigene Proteine als fremd erkennen [48]. Man spricht dabei von Immuntoleranz. Darüber hinaus ist der Körper zusätzlich auf eine periphere und induzierbare Art der Immuntoleranz angewiesen, die nicht über die Reifung im Thymus gewährleistet werden kann. Das ist aus mehreren Gründen notwendig. Zum Ersten tritt der Körper mit körperfremden, aber nicht-pathogenen, Antigenen in Kontakt, bei der eine Immunreaktion kontraproduktiv wäre. Beispielsweise sei hier die Flora des Darms oder der Haut benannt. Zweitens können nicht alle körpereigenen Antigene im Thymus präsentiert werden [49]. Drittens und letztens muss im Rahmen einer sinnvoll induzierten Immunreaktion verhindert werden, dass diese überschießt und körpereigene Zellen schädigt, wie zum Beispiel im oben (3.1.2) genannten Fall der SIRS.

Nach heutigem Kenntnisstand trägt zu der Regulation des Immunsystems wesentlich die immunsuppressive Wirkung der CD4+ Tregs bei. CD4+ Tregs sind ubiquitär auch in nicht-inflammatorischen Zuständen sowohl in lymphatischen als auch nicht lymphatischen Geweben, sowie der Blutbahn vorhanden [32, 50]. Eine besondere Rolle kommt den CD4+ Tregs in der Haut und den Schleimhäuten zu, insbesondere im Gastrointestinaltrakt [51]. In Haut und Schleimhäuten müssen pathogene Einflüsse abgewehrt werden und es kommt ständig zum Kontakt mit verschiedensten Antigenen. Zu erkennen ist das beispielweise daran, dass CD4+ Tregs sich besonders an Invaginationen im Epithel assoziiert mit Haarfollikeln finden. Dort steht das Immunsystem im ständigen Kontakt mit der physiologischen und pathologischen Bakterienflora der Haut, wobei die CD4+ Tregs eine adäquate Immunhomöostase gewährleisten müssen [52].

CD4+ Tregs wirken grundsätzlich suppressiv auf aktivierte T-Effektor-Zellen, also CD4+FoxP3- T-Zellen, ein. Sie können deren Funktion unter anderem mittels Interleukinen unterdrücken. CD4+ Tregs sezernieren hauptsächlich IL-10, IL-35 und TGF- β , die immunsuppressiv auf T-Effektor Zellen wirken [53, 54]. Darüber hinaus exprimieren CD4+ Tregs im hohen Maße den Interleukin-2-Rezeptor (CD25), wobei die Expression

bei Aktivierung nochmals hochreguliert wird. Es wird angenommen, dass dadurch der unmittelbaren Umgebung IL-2 entzogen wird [53-55]. IL-2 ist für die Differenzierung, Homöostase und Funktion von CD4+ Tregs und T-Effektor Zellen essentiell und wird nur von T-Effektor Zellen, nicht aber von CD4+ Tregs gebildet [56, 57]. Wenn CD4+ Tregs ein hohes Maß an IL-2 binden, werden Differenzierung, Homöostase und Funktion der T-Effektor-Zellen gehemmt und die Immunreaktion gebremst. T-Effektor Zellen bilden IL-2 bei Aktivierung verstärkt. CD4+ Tregs, die selbst nicht in der Lage sind IL-2 zu bilden, benötigen dieses um die ihre immunsuppressive Wirkung zu verstärken. Dadurch bilden sie einen negativen Feedback-Mechanismus zu den T-Effektor Zellen [53, 54, 56].

CD4+ Tregs können jedoch auch über die Bildung und Bindung von Interleukinen hinaus suppressiv wirken. Im Rahmen der Immunreaktion werden naive T-Zellen in Lymphknoten rekrutiert und dort über den Kontakt mit dendritischen Zellen aktiviert, die ihnen Antigene präsentieren. CD4+ Tregs verhindern die stabile Interaktion der naiven T-Zellen mit den dendritischen Zellen und damit auch eine effektive Aktivierung der T-Zellen [58].

Es wird jedoch davon ausgegangen, dass im inflammatorischen Zustand beide beschriebenen suppressiven Mechanismen durch aktivierte T-Effektor-Zellen umgangen werden können. Zum einen können aktivierte T-Zellen mittels direkter Zell-Zell-Interaktion Cluster bilden und das freigesetzte IL-2 für die umgebenden CD4+ Tregs schwerer zugänglich machen [55]. Der Unterbindung der Interaktion von T-Effektor Zellen und dendritischen Zellen durch CD4+ Tregs wird bei Inflammation ebenfalls durch verschiedene Mechanismen entgegengewirkt. Zum Beispiel können T-Effektor Zellen durch pro-inflammatorische Zytokine CD4+ Treg Funktionen direkt oder indirekt unterdrücken. Die genauen Mechanismen sind bislang nicht eindeutig geklärt [55]. Eine Übersicht über die wichtigsten Mechanismen kann der Abbildung 2 entnommen werden.

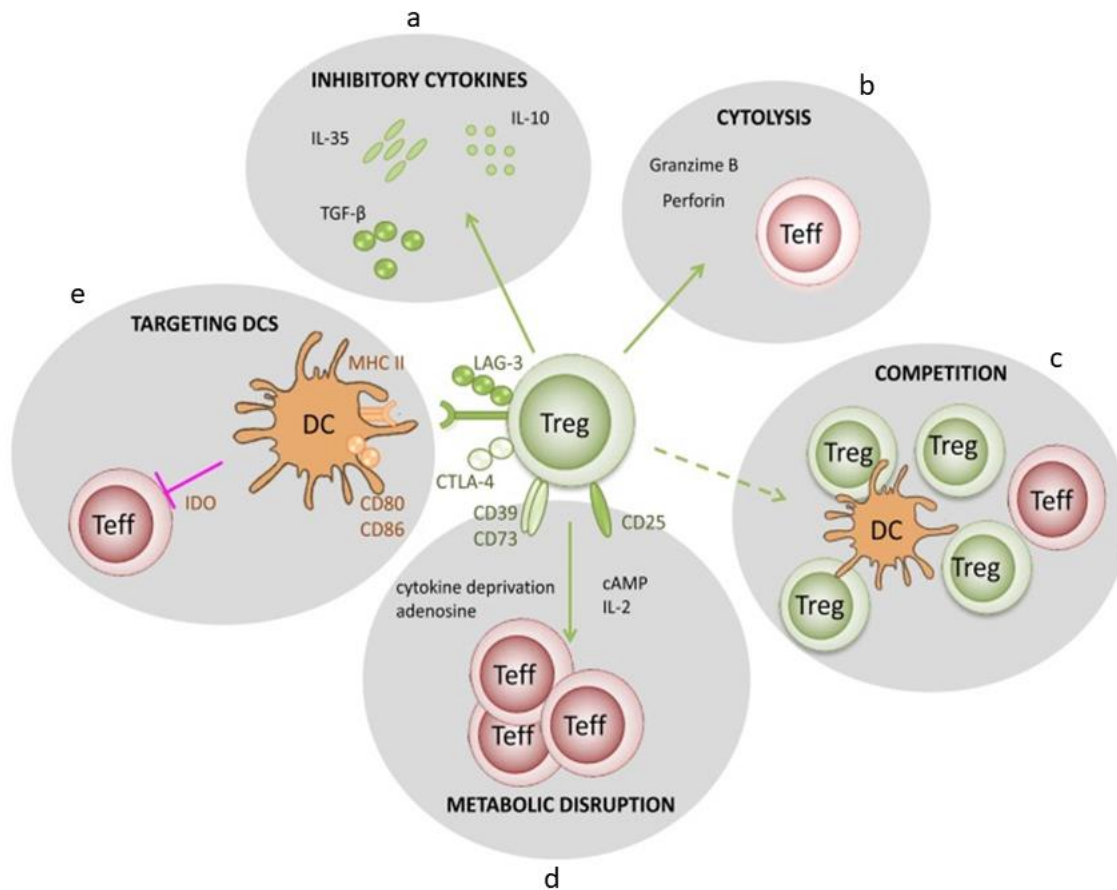


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten immunsuppressiven Funktionen der regulatorischen CD4+ T-Zellen (CD4+ Tregs). (Abbildung aus [59]) Inhibitorische Zytokine (a: Inhibitory Cytokines): CD4+ Tregs sind in der Lage ihre immunsuppressive Wirkung durch verschiedene Mechanismen zu entfalten. Sie können über anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, IL-35 und TGF- β , suppressiv unter anderem auf T-Effektor Zellen wirken. Zytolyse (b: Cytolysis): Zudem sind sie in der Lage mittels Granzymen andere T-Effektor Zellen durch Zytolyse zu zerstören. Verdrängung (c: Competition): CD4+ Tregs verhindern die stabile Interaktion der T-Zellen mit den dendritischen Zellen und damit auch ihre effektive Aktivierung. Metabolische Blockade (d: Metabolic Disruption): Darüber hinaus exprimieren CD4+ Tregs im hohen Maße den Interleukin-2-Rezeptor (CD25), wobei die Expression bei Aktivierung nochmals hochreguliert wird. Es wird angenommen, dass dadurch der unmittelbaren Umgebung IL-2 entzogen wird. Dieses ist für die Differenzierung, Homöostase und Funktion von CD4+ Tregs und T-Effektor Zellen essentiell. Modulation dendritischer Zellen (e: Targeting DCs): Zuletzt können CD4+ Tregs dendritische Zellen insofern modulieren, dass die Aktivierung naiver T-Zellen oder T-Effektor Zellen nicht mehr oder nur unzureichend funktioniert. (Abbildung entnommen aus: M. Caridade, L. Graca, and R. M. Ribeiro, "Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models," (in eng), Front Immunol, vol. 4, p. 378, Nov 18 2013. © 2013 Caridade, Graca and Ribeiro. The cited article is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>, last access August 8th, 2018)

Neben Interleukin-Suppression und Modulation von dendritischen Zellen, können CD4+ Tregs andere T-Effektor- und B-Zellen durch Zytolyse mit Granzymen zerstören [53]. Dadurch wird ebenfalls die Immunreaktion gedämpft. Im humanen Kontext konnte gezeigt werden, dass beispielsweise CD4+ Tregs in der Lage sind CD4+ und CD8+ T-Zellen mittels Granzym A zu lysieren [60]. Im murinen Kontext gibt es ähnliche Forschungsergebnisse, die zum Beispiel die Zytolyse von B-Zellen durch CD4+ Tregs mittels Granzym B zeigen [61].

Weitere Mechanismen der Immunsuppression werden zurzeit diskutiert. Zum Beispiel die Möglichkeit einer Suppression mittels direkter Zell-Zell-Interaktion von CD4+ Tregs auf andere Immunzellen [54]. Eine vollumfassende Definition aller suppressiven Mechanismen steht noch aus.

3.2.3 Die Regulation der CD4+ Tregs

Ein wesentlicher Regulationsmechanismus scheint die Interaktion mit T-Effektor Zellen und dendritischen Zellen mittels Zytokinen, vor allem IL-2, zu sein. Es ist davon auszugehen, dass ein kontinuierlicher Feedback-Mechanismus wesentlich zur Regulation der CD4+ Tregs beiträgt. Dabei gibt es vermutlich Unterschiede in der IL-2-Sensibilität verschiedener CD4+ Treg-Populationen. Campbell beschreibt zwei Typen, CD4+ cTregs (central Tregs), die überwiegend in lymphatischem Gewebe und Organen residieren, und CD4+ eTregs (effector Tregs), die überwiegend im nicht-lymphatischen Gewebe angesiedelt sind. Letztere sind in geringerem Maße auf Stimulation mittels IL-2 angewiesen als CD4+ cTregs [55].

Neben IL-2 gibt es weitere Zytokine, die Einfluss auf die Funktion der CD4+ Tregs nehmen. Hoenig und Mitarbeiter haben dazu eine Übersicht erstellt [62]. Erwähnenswert ist dabei TGF- β , das sowohl die Expression von FoxP3 in der Zellreifung im Thymus als auch die Induktion der Expression von FoxP3 in naiven CD4+ T-Zellen bewirkt. Entgegengesetzt wirken aber pro-inflammatorische Zytokine, die die immunsuppressiven Funktionen der CD4+ Tregs beeinträchtigen. So führt TNF- α zu einer Reduzierung von FoxP3 mRNA und beeinträchtigt die TGF- β -abhängige Differenzierung von CD4+ pTregs [63]. Auch gegenteilige Ergebnisse, in denen die CD4+ Treg-vermittelte Immunsuppression verstärkt sowie die Differenzierung unterstützt wurde, sind in der Literatur zu finden [62, 64]. IL-6, ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, bewirkt anders als TNF- α keine direkte Herabsetzung der CD4+ Treg Funktionen, sondern macht T-Effektor Zellen resistenter gegenüber immunsuppressiven Einflüssen der CD4+ Tregs [65]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zytokin-abhängige Regulation von CD4+ Tregs eine wichtige Rolle in der Homöostase der CD4+ Tregs spielt. Dies unterstreicht auch die Tatsache,

dass erste klinische Studien IL-2 einsetzen, mit dem Ziel den anti-inflammatorischen Effekt von CD4+ Tregs in verschiedenen Krankheitsbildern, besonders aber in Autoimmunerkrankungen, zu nutzen [66, 67].

Wesentlich für die Funktion von T-Zellen generell und damit auch für CD4+ Tregs ist die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor. Smigiell und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Aktivierung von CD4+ eTregs wesentlich auf der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung und der Aktivierung der kostimulatorischen Rezeptoren CD28 und ICOS beruht [68]. Bezüglich der Relevanz der Aktivierung von CD4+ Tregs über den T-Zell-Rezeptor gibt es unterschiedliche Aussagen. Es konnte gezeigt werden, dass eine CD4+ Treg-Aktivierung T-Zell-Rezeptor-unabhängig möglich ist [69]. Dennoch gehen andere Autoren, wie zum Beispiel Sakaguchi und Mitarbeiter, davon aus, dass die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung eine große Rolle für die immunsuppressive Funktion der CD4+ Tregs spielt [32]. Interessant dabei ist, dass sich das T-Zell-Rezeptor-Repertoire der unterschiedlichen CD4+ Treg-Subtypen in unterschiedlichen Geweben unterscheidet [70, 71]. Verglichen mit den T-Zell-Rezeptoren der CD4+FoxP3- T-Effektor Zellen konnte gezeigt werden, dass die Diversität beider Zellpopulationen etwa gleich groß ist [72].

Darüber hinaus herrscht noch kein ausreichend umfassendes Wissen, welche Zellen klinisch relevanten Einfluss auf die Aktivität der CD4+ Tregs haben. Es ist bekannt, dass CD4+ Tregs aktiver zirkulieren als pro-inflammatorische T-Effektor-Zellen und das sowohl spontan, als auch nach Antigenkontakt [73-75]. Darüber hinaus wissen wir, dass die Immunsuppression durch CD4+ Tregs im nicht-lymphatischen Gewebe sowie in den drainierenden Lymphknoten stattfindet [55]. Daher fassen Benoist und Mathis aus der Literatur zusammen, dass es drei unterschiedlich lokalisierte Stadien gibt, in denen Einflussmechanismen relevant für die Regulierung der CD4+ Tregs sein können: die initiale Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten, die Migration der CD4+ Tregs in das inflammatorische Gewebe oder Organ, sowie das Verhalten im Zielorgan beziehungsweise Gewebe [41]. Es ist bekannt, dass sich CD4+ cTregs von CD4+ eTregs in der Expression von CD64L, einem Homing-Rezeptor, unterscheiden. Vermutet wird daher, dass eine Arbeitsteilung zwischen den CD4+ Treg-Subtypen besteht [55, 68]. Hierbei ist allerdings nicht ausreichend geklärt, wie es im Rahmen der Differenzierung zur Bildung des einen oder des anderen Subtyps kommt und welche Steuerungsmechanismen relevant sind. Damit ist der migratorische Prozess und seine Regulation noch nicht ausreichend erforscht. Neben direkten zellulären oder Zytokin-vermittelten Einflüssen mehren sich die Hinweise, dass CD4+ Tregs auch einer metabolischen Regulierung unterliegen [62, 76]. So zum Beispiel einerseits durch die Vitamine A und D, andererseits durch Metaboliten des gastrointestinalen Mikrobioms wie Butyrat, Polysacchariden und Probiotika.

3.2.4 Konsequenzen für die Forschung?

In der Zusammenfassung wird deutlich, dass die Mechanismen mit denen CD4+ Tregs andere T-Effektor-Zellen supprimieren zunehmend besser erforscht werden. Diese sind überwiegend Zytokin-vermittelt und bilden eine Feedback-Schleife, die beide Zelltypen beeinflusst. Darüber hinaus weiß man heutzutage, dass metabolische Einflüsse ebenso eine Rolle für die Regulation der CD4+ Tregs spielen, wobei hier noch viel Forschungsbedarf besteht. Was in großen Teilen völlig unklar scheint, ist die Frage nach der unterschiedlichen Beeinflussbarkeit der unterschiedlichen CD4+ Treg-Subtypen. Einigkeit herrscht, dass die Erkenntnis über Regulation und Steuerbarkeit wesentlich ist für die klinische Anwendung in vielen unterschiedlichen Bereichen, wie beispielsweise der Transplantationsmedizin sowie bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen. Hier gibt es klinisch bereits Fortschritte. In der Trauma- und Sepsisforschung fehlen diese bislang, da nach wie vor grundlegendes pathophysiologisches Verständnis fehlt. Es besteht also großer Bedarf an der Erforschung weiterer klinisch relevanter pathophysiologischer Regulationsmechanismen, die die CD4+ Treg Funktionen modulieren können.

3.3 Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase und dem Immunsystem

3.3.1 Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase

Bereits seit Jahrzehnten bekannt und gut erforscht ist die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase des Blutes. Die erste Beschreibung der Gerinnungskaskade stammt von Morawitz aus dem Jahre 1905 [77]. Die klassische Gerinnungskaskade besteht aus dem humoralen und dem zellulären System. Das humorale System kann entweder extrinsisch über Thromboplastin (Tissue Factor = TF), das von den subendothelialen Zellen bei Endothelverletzung exprimiert wird, oder intrinsisch über Faktor XII (Hagemann Faktor) ausgelöst werden. Die Kaskade führt über die Thrombinbildung zu einer Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, welches wiederum mittels Faktor XIII zu einem Polymer vernetzt wird und damit ein Gerinnsel bildet [18]. Da die Stabilität dieses Gerinnsels keine suffiziente Blutgerinnung gewährleistet, wird das humorale System durch eine zelluläre Komponente verstärkt, deren wichtigste Vertreter die Thrombozyten sind. Dabei laufen die Aktivierungen der humoralen und zellulären Gerinnungskaskade symbiotisch, gleichzeitig, ab. Die Entdeckung von Thrombozyten und deren Rolle in der Hämostase geht etwa auf das Jahr 1865 zurück [78]. Thrombozyten werden ebenfalls durch subendotheliale Matrixproteine, wie Kollagen und dem von-Willebrand-Faktor (vWF), sowie durch Thrombin, freigesetztem ADP und weiteren Mechanismen aktiviert. Dabei verändern sie die Form durch Bildung von Pseudopodien, binden an das Endothel, setzen para- und autokrin aktivierende Signalmoleküle frei und werden mittels verschiedener Rezeptoren

vernetzt um einen stabilen Thrombus zu bilden [79]. Zunehmend im Fokus, und bis vor wenigen Jahrzehnten noch völlig unbekannt, steht eine immunologische Rolle der Thrombozyten.

3.3.2 Die immunologische Rolle der Thrombozyten: Immunothrombose

Heutzutage sprechen viele Autoren von Thrombozyten als immunkompetente Zellen, die eine wesentliche Rolle in der immunologischen Hämostase des Körpers spielen [79-81]. Wenn man begründen möchte, warum Thrombozyten als immunkompetent gelten sollten, so lässt sich das an drei wesentlichen Eigenschaften festmachen. Zum einen sind sie mittels verschiedener Mechanismen in der Lage exogene oder endogene Pathogene zu erkennen. Zum anderen können sie mittels immunmodulatorischer Proteine überwiegend pro-inflammatorisch auf das Immunsystem einwirken [80]. Weiters sind sie in der Lage via Zell-Zell-Kontakt oder mittels Zytokinen mit Zellen des unspezifischen sowie des spezifischen Immunsystems zu interagieren und teilweise steuernd auf diese einzuwirken [79].

Exemplarisch für die thrombozytäre Fähigkeit pathogene Strukturen zu erkennen können einige Rezeptoren genannt werden. Wohl die bekanntesten Rezeptoren für die Erkennung pathogener Moleküle sind die Toll-Like-Rezeptoren (TLR), von denen mittlerweile 13 beschrieben wurden. Es besteht bis heute allerdings keine abschließende Auflistung aller Liganden der verschiedenen TLRs [82]. Auf humanen sowie murinen Thrombozyten wird übereinstimmend das Vorkommen von TLR2, TLR4 und TLR9 beschrieben [80]. TLR2 wird auf Thrombozyten exprimiert und spielt eine Rolle bei Aktivierung und Aggregation [83]. TLR2 bindet verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)), die z.B. von Bakterien freigesetzt werden. Darunter finden sich bakterielle Lipopeptide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure als Bestandteil der gram-positiven Bakterienzellwand [84]. Neben TLR2 ist auch die Expression von TLR4 auf Thrombozyten relevant für die Erkennung pathogener Strukturen. TLR4 Rezeptoren erkennen Lipopolysaccharide (LPS), einen wesentlichen Bestandteil der gram-negativen bakteriellen Zellwand [85]. Die Stimulation durch TLR4 führt zu einer Degranulation und verstärkten Aggregation von Thrombozyten [86]. Zum anderen wird vermutet, dass Thrombozyten nach aktiver Bindung von Bakterien mittels TLR4 diese den neutrophilen Granulozyten präsentieren und diese wiederum aktivieren [87]. Neutrophile Granulozyten extrahieren nach der benannten Aktivierung durch Thrombozyten extrazelluläre „Fallen“, die sogenannten NETs („Neutrophil extracellular traps“ (Neutrophile extrazelluläre Fallen)), die das Ausbreiten der Bakterien im Blutstrom verhindern [88]. Darüber hinaus sind Thrombozyten auch in der Lage mit verschiedensten Rezeptoren direkt an Oberflächenproteine von Bakterien zu binden, beispielsweise GPIb, α IIb β 3 und GPIIb/IIIa. Bei verschiedenen Pathogenen (beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*) konnte

gezeigt werden, dass die Aktivierung dieser thrombozytären Rezeptoren für die Pathogenabwehr relevant ist [81].

Neben der Erkennung von und der Aktivierung durch Pathogene können Thrombozyten auch auf andere Weise Zellen des Immunsystems beeinflussen. Sie sind in der Lage verschiedenste immunmodulatorische Proteine freizusetzen. Diese werden in den verschiedenen Granula gespeichert und bei thrombozytärer Aktivierung freigesetzt [88]. Quantitativ am häufigsten sind die α -Granula, die einen Großteil der immunmodulatorischen Proteine speichern. α -Granula machen etwa 10% des Gesamtvolumens eines Thrombozyten aus und können mit der Zellmembran fusionieren, um so zum einen die Inhaltsstoffe freizusetzen und zum andern, durch die Fusion von Zellwand und Vesikelmembran, eine Größenänderung zu bewirken [89, 90]. α -Granula enthalten Adhäsionsmoleküle (beispielsweise Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor), Gerinnungsfaktoren (bspw. Faktor V, VII, XI, XII), Mitogene (bspw. PDGF, TGF- β), Angiogene (bspw. VEGF), Protease Inhibitoren, Immunglobuline, Chemokine (bspw. PF4, MIP-1 α , RANTES, GRO α), sowie Rezeptoren (bspw. GPIb α , GPIIb/IIIa, P-Selektin), die bei der Fusion mit der Zellmembran auf selbige gelangen [91, 92]. Neben den α -Granula gibt es die sogenannten elektronendichten Granula. Diese beinhalten überwiegend ADP, ATP, Histamin, Serotonin, Calcium und Magnesium und machen mit etwa 1% des gesamtthrombozytären Volumens quantitativ bedeutend weniger der Granula aus als die α -Granula [81, 91, 93]. Als neueste Gruppe, neben den bereits lang bekannten erstgenannten Granula, haben Thon und Mitarbeiter eine neue Form von Granula beschrieben, die sie T-Granula genannt haben [94]. Deren Zusammensetzung von Inhaltsstoffen ist noch nicht ausreichend geklärt.

Neben der Möglichkeit bereits synthetisierte immunmodulatorische Proteine freizusetzen ist seit neuestem eine weitere Form der Freisetzung im Fokus der Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten trotz fehlendem Zellkern nach Aktivierung Proteine de novo synthetisieren [95, 96]. Dies ist insofern von Interesse, da vermutet wird, dass je nach Aktivierung unterschiedliche Proteine gebildet werden [95]. Damit wäre es Thrombozyten möglich auf unterschiedliche Stimuli mit unterschiedlichen Freisetzungen von nicht-präformierten immunmodulatorischen Proteinen zu reagieren.

Aus den von Thrombozyten freigesetzten immunmodulatorischen Proteinen, sei es durch Granulafreisetzung oder de novo Synthese, gilt es einige aufgrund ihrer herausragenden immunologischen Funktion exemplarisch zu nennen. PF4 (CXCL4): Plättchenfaktor 4 oder auch CXCL4 ist in sehr hohen Konzentrationen in den Granula der Thrombozyten gespeichert. PF4 induziert die Aktivierung, Differenzierung und Rekrutierung von Monozyten, sowie die Neutrophilenadhäsion an Endothelzellen [97]. sCD40L (CD154): Der überwiegende Anteil des zirkulierenden CD40L wird von aktivierten

Thrombozyten gebildet [98]. Es wird daher vermutet, dass anhand des quantitativen Levels an zirkulierendem sCD40L der Grad der Thrombozytenaktivierung abgeschätzt werden kann [88]. Durch die Freisetzung von sCD40L sind Thrombozyten in der Lage dendritische Zellen und naive T-Zellen zu aktivieren, T-Zell-abhängige B-Zell-Differenzierung zu unterstützen und eine Hochregulierung von ICAM-1 auf Endothelzellen zu bewirken, was die Adhäsion von Leukozyten an selbige verbessert [92]. RANTES (CCL5): Im Jahr 2004 konnten Danese und Mitarbeiter zeigen, dass RANTES nach CD40 abhängiger Thrombozytenaktivierung von selbigen freigesetzt wird [99]. RANTES ist ein Chemokin, das in der Lage ist die Migration und Rekrutierung von dendritischen Zellen, NK Zellen, eosinophilen Zellen, Mastzellen und basophilen Zellen zu induzieren [100]. MIP-1 α (CCL3): MIP-1 α gehört ebenso wie RANTES zu den Chemokinen und wird aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt. Es wirkt chemotaktisch auf basophile und eosinophile Granulozyten. Darüber hinaus vermittelt es die Histaminfreisetzung aus den erstgenannten Zellen [101]. Zudem wirkt MIP-1 α chemotaktisch auf Monozyten [102] und beeinflusst im inflammatorischen Setting das Verhalten von NK Zellen und dendritischen Zellen [91]. TGF- β : Das quantitative Vorkommen des immunsuppressiv wirkenden TGF- β wird ebenso wie sCD40L wesentlich von der thrombozytären Freisetzung bestimmt. Dies wird vermutet, da Patienten mit Thrombozytopenie niedrigere TGF- β Level im Blut aufweisen als gesunde Patienten und nach therapeutischer Intervention mit Anstieg der Thrombozytenzahlen auch die TGF- β Level wieder ansteigen. TGF- β ist wachstumshemmend und immunsuppressiv. Es wirkt auf Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen, bei letzteren insbesondere auf CD4+ regulatorische T-Zellen [91].

Neben der indirekten Interaktion mit Immunzellen können Thrombozyten auch direkt mit dem unspezifischen sowie dem spezifischen Immunsystem interagieren. Interaktionen von Thrombozyten mit Zellen des unspezifischen Immunsystems wurden in den letzten Jahren immer besser erforscht. So bilden Thrombozyten zusammen mit neutrophilen Granulozyten Komplexe, vermittelt durch eine P-Selektin/PSGL-1 Interaktion. Dabei wirken Thrombozyten aktivierend auf die neutrophilen Granulozyten und tragen zu deren Degranulation bei [103]. Besonders zu erwähnen ist, dass die Bildung von NETs wesentlich von der Thrombozyten/Neutrophilen-Interaktion abhängig sind [104, 105]. Bei diesem Prozess stoßen neutrophile Granulozyten gerinnungsfördernd wirkende Histone und DNA aus, ferner Inhaltsstoffe wie z.B. Myeloperoxidase und neutrophile Elastase, die antibakteriell wirken [79]. Somit wirken „NETs“ antibakteriell, indem sie die Verbreitung von Bakterien im Blutstrom verhindern. Ebenso sind Thrombozyten in der Lage, ebenfalls initiiert durch eine P-Selektin/PSGL-1 Interaktion, an Monozyten zu binden, mit diesen Komplexe zu bilden und diese zu aktivieren [95, 106].

Interaktionen von Thrombozyten mit Zellen des spezifischen Immunsystems sind, im Gegensatz zu den unspezifischen, bislang weniger gut erforscht. Bekannt ist, dass Thrombozyten B-Zellen zur Differenzierung und zum Immunglobulinklassenwechsel verhelfen um eine suffiziente Immunantwort zu unterstützen. Zudem unterstützen sie den Reifungsprozess in den Keimzentren der Lymphozyten [80, 107]. Hierbei ist es ausreichend, wenn der Kontakt zwischen sogenannten Thrombozytären Mikropartikeln, also kleine, abgeschnürte Thrombozytenanteile in einer Größe von weniger als $1\mu\text{m}$ [108], und B-Zellen stattfindet [109]. Wesentlich für die Interaktion von Thrombozyten und Zellen des spezifischen Immunsystems ist die Interaktion mittels CD40 und seinem Ligand CD40L (CD154) [110]. Dies ist relevant für die hier beschriebene T-Zell-abhängige humorale Immunantwort. Dabei exprimieren Thrombozyten sowohl CD40 als auch seinen Liganden CD40L auf der Zelloberfläche [111]. Garraud und Mitarbeiter haben beschrieben [80], dass Thrombozyten CD40/CD40L-abhängig aktivierend wirken, sowohl auf T-Zellen, als auch Vertreter des spezifischen Immunsystems, als auch auf Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und NK Zellen [80, 92, 95, 107]. Die Interaktion von Thrombozyten und CD4+ T-Zellen wurde bereits in mehreren Organsystemen beschrieben. Im Setting des postischämischen Gewebeschadens der Leber konnte beispielsweise eine Kolokalisation von Thrombozyten und CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden. Ferner wurde hier nachgewiesen, dass kostimulatorische Moleküle wie CD40 und CD28 für die Interaktion der Zelltypen notwendig sind [112].

Aufgrund all der in diesem Abschnitt genannten thrombozytären Eigenschaften und um die immunologisch relevante Interaktion von Thrombozyten mit dem Immunsystem zu beschreiben, haben Engelmann und Massberg treffend den Begriff „Immunothrombosis“ (Immunothrombose) geformt [79].

3.3.3 Die Rolle der Thrombozyten nach Trauma

Es gibt vergleichsweise viele Studien zum immunologischen Verhalten der Thrombozyten im Rahmen des septischen Geschehens und bei kritisch kranken Patienten („critical illness patients“). Dazu haben de Stoppelaar und Mitarbeiter eine Übersicht erstellt [113]. Weniger Klarheit herrscht in Bezug auf das posttraumatische Geschehen, wobei auch hierzu Studien vorhanden sind [114-117]. Beide Forschungsbereiche weisen bezüglich der Immunologie Überschneidungen auf. So entwickelte sich in einer Studie von Hoover und Mitarbeiter bei 90% der Traumapatienten innerhalb einer Woche ein SIRS, was das Risiko einer nosokomialen Infektion, und damit einer Sepsis, signifikant erhöhte [6]. Als erste wesentliche Schlussfolgerung aus den oben genannten Studien kann gezogen werden, dass Thrombozytopenie in kritisch kranken Patienten, sowie in septischen Patienten, mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist [118-120]. Zum zweiten ist die Funktionalität der Thrombozyten und die

Thrombozytenaggregation in septischen beziehungsweise kritisch kranken Patienten beeinträchtigt und mit MODS [121] und einer höheren Mortalität [122] vergesellschaftet.

Besser untersucht als das posttraumatische immunologische Verhalten der Thrombozyten ist die posttraumatische Gerinnung, in welcher die Thrombozyten eine Rolle spielen. Nach traumatischer Verletzung kommt es in vielen Fällen zu einer Störung der Gerinnung, der sogenannten Trauma-induzierten Koagulopathie, welche sich klinisch in diffusen Blutungen äußert. Diese ist schwer zu diagnostizieren, da bislang außer der viskoelastischen Gerinnungsmessung keine geeigneten Verfahren vorhanden sind, die eine exakte Definition des Krankheitsbilds möglich machen [123, 124]. Ursächlich und aggravierend für das Krankheitsbild sind nach jetzigem Kenntnisstand Gewebeverletzung, Hypoperfusion, Schock, Verdünnung, Hypothermie, Azidose und Inflammation [123, 125]. Es wird im Rahmen der Trauma-induzierten Koagulopathie ein Verlust von relevanten prokoagulativen Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen (Faktor I), II, V, VII und X), sowie Kalzium (Faktor IV) beobachtet [126]. Zudem ist in diesem Zustand aktiviertes Protein C relevant antikoagulatorisch wirksam [127, 128]. Es besteht darüber hinaus häufig eine Hyperfibrinolyse, deren Ausmaß prognostisch für die Mortalität ist [129, 130]. Mithilfe klassischer Gerinnungsmessverfahren, wie der Bestimmung des INR und aPTT, können Pathologien im Rahmen der Trauma-induzierten Koagulopathie detektiert werden. Sie sind jedoch aufgrund der unphysiologisch hohen Konzentration an Kalzium und der Durchführung bei normaler Körpertemperatur nicht aussagekräftig im Hinblick auf Hypokalziämie, Verdünnungseffekte und Hypothermie. Daher wird auch ihre Nützlichkeit im klinischen Setting immer mehr in Frage gestellt [131]. Aufgrund dieses Umstandes hat sich in den letzten Jahren mehr und mehr die Verwendung von viskoelastischen Verfahren zur Gerinnungsmessung etabliert [132, 133], mit der sich beispielsweise Hyperfibrinolyse diagnostizieren lassen [130]. Die Verfahren werden als Thromboelastografie (TEG®) oder Rotationsthromboelastometrie bezeichnet (ROTEM®). Mit Hilfe dieser Verfahren lassen sich Störungen im humoralen und dem zellulären Gerinnungssystem, also im Schwerpunkt den Thrombozyten, differenzieren [134]. So gehen Schöchl und Mitarbeiter von einer Störung der Thrombingenerierung ab einer Clotting Time von über 80 Sekunden aus bei externer Stimulierung aus [135]. Interessanterweise zeigten darüber hinaus drei verschiedene Studien, die die posttraumatische Thrombozytenfunktionalität in Bezug auf die Hämostase untersuchten, bei unterschiedlichen Messmethoden dasselbe Ergebnis. Es konnte in allen drei Studien gezeigt werden, dass eine eingeschränkte Funktionalität der Thrombozyten in Bezug auf die Gerinnung auf ein schlechteres Outcome hinweist. Die verminderte Funktionalität war assoziiert mit einer gesteigerten Mortalität [115-117] und einem geringeren Glasgow Coma Scale (GCS) [116]. Bislang fehlt allerdings noch das genaue

physiologische Verständnis um die eingeschränkte Thrombozytenfunktion nach Trauma ausreichend erklären zu können.

3.3.4 Konsequenzen für die Forschung?

Wie oben beschrieben ist bekannt, dass Trauma zur immunologischen und hämostatischen Aktivierung von Thrombozyten führt. Forschungsbedarf besteht zum einen in der weiteren Klärung der immunologischen Funktionen. Die Annahme, dass Thrombozyten im Immunsystem eine Wächterfunktion („Sentinel-Hypothese“) einnehmen und aktivierend auf Immunzellen wirken, besteht schon länger. Unklar ist jedoch, ob Thrombozyten auch eine anti-inflammatorische Funktion haben können. Darüber hinaus besteht ein weiterer wesentlicher Forschungsbedarf im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen „immunologischer“ und „hämostatischer“ Funktion. Von Interesse ist, welche Mechanismen, beziehungsweise Rezeptoren, in diesen Funktionen eine Rolle spielen.

4 Forschungsfragen

Folgende Forschungsfragen wurden im Rahmen der Dissertation aufgestellt und experimentell adressiert:

- A: Werden CD4+ Tregs posttraumatisch schneller aktiviert als CD4+ non-Tregs?**
- B: Modulieren Thrombozyten die frühe posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?**
- C: Modulieren Thrombozyten die späte posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?**
- D: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten?**
- E: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Hämostase?**

5 Material und Methoden

5.1 Puffer und Chemikalien

In den Versuchen wurden die untenstehenden Puffer und Chemikalien verwendet. Die Zellisolierung wurde in C5 Kulturmedium durchgeführt und die Zellfärbung mit PBA Puffer. Die Zellen wurden mit verdünntem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Die Erythrozytenlyse wurde mit Lysepuffer durchgeführt. Das gewonnene Vollblut wurde mit einer Citratlösung antikoaguliert. Die Applikation der Depletions-Antikörper erfolgte nach Verdünnung durch PBS oder Kochsalzlösung. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1: Verwendete Puffer und Chemikalien) sind die verwendeten Medien detailliert aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Chemikalien

Puffer und Chemikalien	Inhaltsstoffe und Hersteller
C5 Kulturmedium	RPMI 1640 versetzt mit MEM, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamine 200 mM, HEPES Pufferlösung 1 M, 2-Mercaptoethanol und 5% FBS, alle von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBA Puffer	PBS versetzt mit Albumin (Rinderserum) und Natrium Azid, von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PFA 0,15% und 0,3%	Paraformaldehyd-Lösung von Carl Roth GmbH, Karlsruhe verdünnt mit PBS von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS	PBS von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	Methanol von Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Lysepuffer	Ammonium Chlorid von Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Dextrose und HEPES Pufferlösung beides von Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA) gelöst in ddH ₂ O von B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
ddH₂O	ddH ₂ O von B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Citratlösung	3,1%iges Trisodium-Citrat von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) gelöst in ddH ₂ O von B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Thrombin	Thrombin (100 U/ml) von Baxter (Deerfield, IL, USA)

5.2 Antikörper

Die in den Versuchen verwendeten Antikörper sind in den untenstehenden Tabellen (Tabelle 2: Verwendete Depletionsantikörper und Isotypkontrollen) aufgeführt.

Zur Durchführung der Depletionsverfahren wurden die untenstehenden Antikörper beziehungsweise Seren verwendet. Zu den Depletionsantikörpern beziehungsweise Seren wurden von beiden Herstellern entsprechende Isotypkontrollantikörper/serum empfohlen. Diese wurden entsprechend verwendet und sind unten aufgeführt (Tabelle 2: Verwendete Depletionsantikörper und Isotypkontrollen).

Tabelle 2: Verwendete Depletionsantikörper und Isotypkontrollen

Depletionsantikörper und Isotypkontrollen	Hersteller
Kaninchen Anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	Accurate Chemical & Scientific Cooperation (Westbury, NY, USA)
Isotypkontrollserum	Accurate Chemical & Scientific Cooperation (Westbury, NY, USA)
PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender Antikörper	BioXCell (West Lebanon, NH, USA)
Isotypkontrolle: HRPN (Monoklonaler Antikörper Ratte IgG1; anti Meerrettich Peroxidase)	BioXCell (West Lebanon, NH, USA)

Die Färbung der CD4+ Tregs wurde durch eine Positivkontrolle verifiziert. Dazu wurden die Zellen mit einem anti-CD3 ϵ Antikörper stimuliert. CD3 ϵ ist ein Teil des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex [136] und wird in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 3: Verwendeter Stimulationsantikörper für CD4+ Tregs).

Tabelle 3: Verwendeter Stimulationsantikörper für CD4+ Tregs

Stimulationsantikörper	Hersteller
Anti-CD3ϵ (anti-Maus)	BioLegend (San Diego, CA, USA)

Die untenstehenden Antikörper wurden für die intrazelluläre Färbung und Oberflächenfärbung für Durchflusszytometrie und Phospho-Durchflusszytometrie verwendet.

Die Verwendung eines Fc-Blocks schloss Bias durch Bindung gefärbter Antikörper am Fc-Teil aus. Für die Identifizierung wurden der Oberflächenmarker CD4 und der intrazelluläre Marker FoxP3 gewählt. Für die Oberflächenfärbung wurden folgende Antikörper verwendet: anti-CD44, anti-CD69, anti-CD62L, anti-GITR, und anti-CD120b (TNF-RII).

Zur intrazellulären phospho-durchflusszytometrischen Färbung wurden folgende primäre Antikörper gewählt: anti-ZAP-70, anti-pZAP-70, anti-PKC- θ and anti-pPKC- θ . Diese wurden von einem farbmarkierten, sekundären Antikörper, Alexa Fluor 555 (konjugiertes Fab-Fragment), gebunden und sichtbar gemacht. Die Antikörper für die CD4+ Treg-Färbung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 4: Antikörper für CD4+ Treg-Färbung).

Tabelle 4: Antikörper für CD4+ Treg-Färbung

Antikörper (AK)	Reaktivität	Fluorochrom	Hersteller
anti-CD16/32 (Fc-Block)	anti-Maus	-	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD4	anti-Maus	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-CD4	anti-Maus	FITC	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD4	anti-Maus	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD44	anti-Maus	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-CD69	anti-Maus	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD62L	anti-Maus	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-GITR	anti-Maus	PE	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
anti-CD120b (TNF-R Type II/p75)	anti-Maus	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-FoxP3 (intrazellulär)	anti-Maus	FITC	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-ZAP-70 (99F2) (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-p-PKC-θ (Thr 538) (intrazellulär, primärer AK)	Kaninchen anti-Maus	-	CellSignaling Technology (Danvers, MA, USA)
Alexa Fluor_555 (konjugiertes F(ab)'2 Fragment) (intrazellulär, sekundärer AK)	Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor 555	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

Die Thrombozytenfärbung erfolgte mit dem Antikörper anti-CD41 zur Identifizierung und den Antikörpern anti-CD62P, anti-CD63 und anti-CD289 (TLR9) zur Messung der Aktivität. Die Antikörper für die Thrombozyten-Färbung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 5: Antikörper für Thrombozyten-Färbung).

Tabelle 5: Antikörper für Thrombozyten-Färbung

Antikörper	Reaktivität	Fluorochrom	Hersteller
Anti-CD41	anti-Maus	eFluor®450	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Anti-CD41	anti-Maus	APC	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Anti-CD41	anti-Maus	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Anti-CD41	anti-Maus	FITC	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Anti-CD62P (P-Selektin)	anti-Maus	APC	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Anti-CD63	anti-Maus	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Anti-CD289 (TLR-9)	anti-Maus	FITC	eBioscience (San Diego, CA, USA)

5.3 Geräte und dazugehörige Reagenzien

Die Präparation der Mäuse vor der Verbrennung erfolgte mit einem handelsüblichen Rasierer (Modell HC-5600 von Remington). Das Verbrennungsmodell zur Traumainduktion wurde durchgeführt in einem Wasserbad (JBN5, Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK). Für alle durchflusszytometrischen Messungen wurden der MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Die für den Betrieb benötigten Reagenzien: MACSQuant® Calibration Beads, MACSQuant® Running Buffer, MACSQuant® Washing Solution und MACSQuant® Storage Solution wurden von derselben Firma bezogen. Alle thromboelastometrischen Messungen wurden mit ROTEM®delta (TEM International, München) durchgeführt. Auch hier wurden die für die Messung benötigten Reagenzien star-tem® (Rekalzifizierung) und ex-tem® (Tissue Factor-Aktivierung) von derselben Firma bezogen.

5.4 Medikamente

Zur Narkotisierung der Tiere wurde eine Mischung aus Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg), Xylazin (Xylavet®, CP-Pharma Handelsges.mbH, Burgdorf) und einer Kochsalzlösung verwendet. Zur Analgesie in den 7-Tages-Versuchsgruppen wurde Xylocain Gel (Aspen, Germany GmbH, München) für die lokale und Buprenorphin (Temgesic®, Indivior Schweiz AG, Baar, Schweiz) für die systemische Analgesie angewendet. Zur intraoperativen Prävention von Augenschädigungen durch Austrocknen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen®, Bayer AG, Leverkusen) verwendet. Die verwendeten Medikamente sind in folgender Tabelle aufgeführt (Tabelle 6: Verwendete Medikamente).

Tabelle 6: Verwendete Medikamente

Medikamente	Handelsname
Ketamin	Ursotamin®
Xylazin	Xylavet®
Kochsalzlösung (0,9%NaCl)	Kochsalzlösung (0,9%NaCl), B.Braun
Buprenorphin	Temgesic®
Xylocain Gel	Xylocain Gel 2%
Augensalbe	Bepanthen®

5.5 Tiere

Es wurden 128 männliche C57BL/6N Mäuse (22-26g, 8-10 Wochen alt) als Versuchstiere verwendet. Diese wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden in den Einrichtungen des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar in München gehalten. Die Einrichtung gewährte eine vollumfassende Versorgung der Tiere mit Futter, Wasser (ad libitum), Klimatisierung, regelmäßiger Kontrolle sogenannter Sentinel-Tiere auf Krankheiten, 12h Hell-Dunkel-Wechselbeleuchtung unter reinen Bedingungen. Die Betreuung und regelmäßige Kontrolle der Tiere übernahmen ausgebildete Tierpfleger. Die Versuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-164-12). Es wurde bei allen durchgeführten Versuchen größtmögliche Anstrengungen unternommen, die Belastungen für die Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Nach Akklimatisierung der Tiere für 7 Tage wurde entsprechend der ARRIVE Guidelines eine Randomisierung der Tiere für die Versuche vorgenommen [137]. Eine Übersicht über alle verwendeten Versuchstiere findet sich nachfolgend in Tabelle 7.

Tabelle 7: Verwendete Versuchstiere

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Zeit bis Euthanasie	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	2h	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	2h	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten-Depletion	2h	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten-Depletion	2h	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	7d	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	7d	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten-Depletion	7d	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten-Depletion	7d	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender-Antikörper	2h	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender-Antikörper	2h	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrolle Treg-Depletion (HRPN)	2h	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrolle Treg-Depletion (HRPN)	2h	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender-Antikörper	7d	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender-Antikörper	7d	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrolle Treg-Depletion (HRPN)	7d	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrolle Treg-Depletion (HRPN)	7d	n=9
Gesamt				n=128

5.6 Depletionsmodell

Um mögliche Interaktionen nachweisen zu können, wurden in unterschiedlichen Versuchsgruppen sowohl Thrombozyten als auch CD4⁺ Tregs mittels *in vivo* Applikation von Antikörpern depletiert, um anschließend Aktivitätsänderungen des jeweiligen anderen Zelltyps messen zu können.

5.6.1 Depletion Thrombozyten und Isotypkontrolle

Den 22-26g schweren Mäusen der Thrombozyten-Depletions-Versuchsgruppen wurden 2h vor Intervention 50µl Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum, verdünnt in 500µl NaCl-H₂O-Lösung, mit einer 23G Kanüle aus einer 1ml Spritze langsam intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Dabei wurde darauf geachtet, den Darm und andere Organe nicht zu verletzen. Den Mäusen der entsprechenden Kontrollgruppen wurde 2h vor Intervention 50µl des Kontroll-Serums verdünnt in 500µl NaCl-H₂O-Lösung, wie oben beschrieben, langsam i.p. verabreicht. In Pilotstudien wurde anhand von kleinen Versuchsgruppen der Depletionserfolg sowie die Isotypkontrolle mittels Durchflusszytometrie und ROTEM[®] Analyse kontrolliert. Die Depletion der Thrombozyten wurde vor den Hauptexperimenten in einer Pilotstudie durchgeführt. Um zu zeigen, dass die Applikation des Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum zu einer suffizienten Depletion der Thrombozyten führte, wurde in einer kleinen Versuchsgruppe (n=3) dieses Serum wie in 5.6.1 beschrieben appliziert. Die Tiere wurden nach 2 Stunden euthanasiert (5.7.5), das Blut kardial entnommen (5.9.1) und die Thrombozytenpopulation analysiert (5.10.6). Ebenso wurde mit dem Isotypkontrollserum verfahren. Neben dem Erfolg der Depletion wurde ebenfalls überprüft, wie lange die Depletion der Thrombozyten anhält. Dazu wurde in kleinen Versuchsgruppen (n=3) Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum wie im obigen Teil dieses Abschnitts beschrieben appliziert. Die Tiere wurden nach 2, 3 oder 4 Stunden euthanasiert (5.7.5), das Blut kardial entnommen (5.9.1) und die Thrombozytenpopulationen auf die Effektivität der Depletion hin untersucht (5.10.6).

5.6.2 Depletion CD4⁺ Tregs und Isotypkontrolle

Den circa 25g schweren Mäusen der CD4⁺ Treg Depletions-Versuchsgruppen wurden 72h vor Intervention 73µl PC-61 (anti-CD25) depletierender Antikörperlösung (0,25mg reiner AK), gelöst in 500µl PBS-Lösung, mit einer 23G Kanüle aus einer 1ml Spritze, langsam i.p. verabreicht. Dabei wurde darauf geachtet den Darm und andere Organe nicht zu perforieren. Den Mäusen der entsprechenden Kontroll-Versuchsgruppen wurde 57,2µl der Isotypkontrollantikörperlösung HRPN (0,25mg reiner AK), gelöst in 500µl PBS-Lösung langsam i.p. verabreicht. Anhand von kleinen Versuchsgruppen (n=3-6) wurde der Depletionserfolg sowie der Isotypkontrollantikörper durchflusszytometrisch kontrolliert. Die Depletion

der CD4+ Tregs wurde vor den Hauptexperimenten in einer Pilotstudie durchgeführt. Dazu wurde PC-61, wie im oberen Teil dieses Abschnitts beschrieben, appliziert. Die Tiere wurden nach 2 Stunden euthanasiert (5.7.5), Lymphknoten und die Milz entnommen (5.8.1) und die CD4+ Treg-Populationen analysiert (5.10.3). Ebenso wurde mit dem Isotypkontrollantikörper HRPN verfahren, um nachweisen zu können, dass keine Depletion stattfand. In dem Hauptexperiment wurde zur Kontrolle nachvollzogen, um wieviel Prozent der Anteil der CD4+ Tregs an allen CD4+T-Zellen zurück ging.

5.7 Verbrennungsmodell

Um ein standardisiertes, in der Literatur beschriebenes und gut reproduzierbares Trauma induzieren zu können, wurde das murine Verbrennungsmodell angewendet.

5.7.1 Narkose und Analgesie

Alle Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Präparation sowie der Traumaintervention unter Vollnarkose. Die Tiere, deren Organe bereits nach 2 Stunden gewonnen wurden, wurden über den gesamten Verlauf des Experiments bis zur Euthanasie in Narkose belassen. Dabei wurde die Narkosetiefe alle 30min durch die Setzung eines Schmerzreizes überprüft (Zwischenzehenreflex). Als Narkotikum wurde ein gewichtsadaptiertes Gemisch aus Ketamin/Xylazin und Kochsalzlösung (200mg/kgKG: 10mg/kgKG in 200µl) langsam i.p. verabreicht. Auch hier wurde auf die Schonung der inneren Gewebsstrukturen geachtet. Während der Narkose wurden den Tieren pro Auge je ein stecknadelkopfgroßer Tropfen Augensalbe auf die Hornhaut aufgetragen, um das Austrocknen zu verhindern. Diese Applikation wurde während der Narkose alle 30min wiederholt. In den Gruppen, in denen die Versuchstiere nach 7 Tagen euthanasiert wurden, erfolgte die Analgesie mittels Buprenorphin. Dieses wurde bei allen Tieren der 7-Tages-Versuchsgruppen bereits vor Beendigung der Narkose gewichtsadaptiert (0,1mg/kg KG) s.c. appliziert. Anschließend wurde dieselbe Dosis für 72 Stunden, alle 8 Stunden, s.c. verabreicht. Zur direkten posttraumatischen Analgesie wurde, ebenfalls vor Beendigung der Narkose, einmalig Xylocain-Gel auf die Wundränder aufgetragen. Die Beschau der Versuchstiere der 7-Tages-Versuchsgruppen erfolgte regelmäßig alle 8 Stunden durch den Versuchsdurchführenden, sowie intermittierend dazwischen durch die Tierpfleger des ZPF. Entsprechend definierter Abbruchkriterien wurden Tiere, die über das definierte Maß hinaus belastet waren, sofort euthanasiert.

5.7.2 Präparation der Versuchstiere

Um eine einheitliche Verbrennung der Hautoberfläche zu erreichen, wurde den Tieren vor der Traumainduktion der Rücken rasiert. Dies geschah mit einem handelsüblichen Rasierer (Modell HC-5600 von Remington) unter Narkose.

5.7.3 Verbrennung

Ziel der Traumainduktion war es eine Verbrennung III° Grades von 25% der gesamten Körperoberfläche zu erreichen. Um diese Verbrennung zu standardisieren wurde ein Modell angewendet, bei dem die zu verbrennende Hautoberfläche für 9 Sekunden 90°C heißem Wasser ausgesetzt wird. Um das definierte Hautareal zu verbrennen wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen. Die narkotisierten Tiere wurden nach der Rasur der Rückenbehaarung in eine präparierte 50ml Perfusorspritze gelegt. Der Kopf zeigte dabei in die Richtung der offenen Spritzendüse. In den Spritzenzylinder wurde zuvor eine Öffnung, die etwa 25% der Gesamtkörperoberfläche entspricht, geschnitten. Diese wurde vom rasierten Rücken der Maus bedeckt. Auf der gegenüberliegenden Seite, der abdominellen Seite der Maus, wurde zuvor eine kleinere Öffnung geschnitten, durch die ein entsprechend zurechtgeschnittener Haushaltsschwamm gesteckt wurde. Mit diesem Schwamm wurde die Maus vorsichtig gegen die Öffnung auf der Rückenseite der Perfusorspritze gedrückt, so dass die Rückenhaut die Öffnung abdichtete und kein Wasser durch die Öffnung in die Spritze eindringen konnte. Das zur Griffplatte der Spritze hinzeigende offene Ende des Spritzenzylinders wurde durch die Gummiabdichtung des Spritzenstempels wasserdicht verschlossen. Das Loch der Spritzendüse blieb stets offen und wurde zu jedem Zeitpunkt über der Wasseroberfläche gehalten. Dadurch war eine suffiziente Atmung der Versuchstiere jederzeit sichergestellt.

Die Präparation der Spritze ist in folgender Abbildung 3 dargestellt:

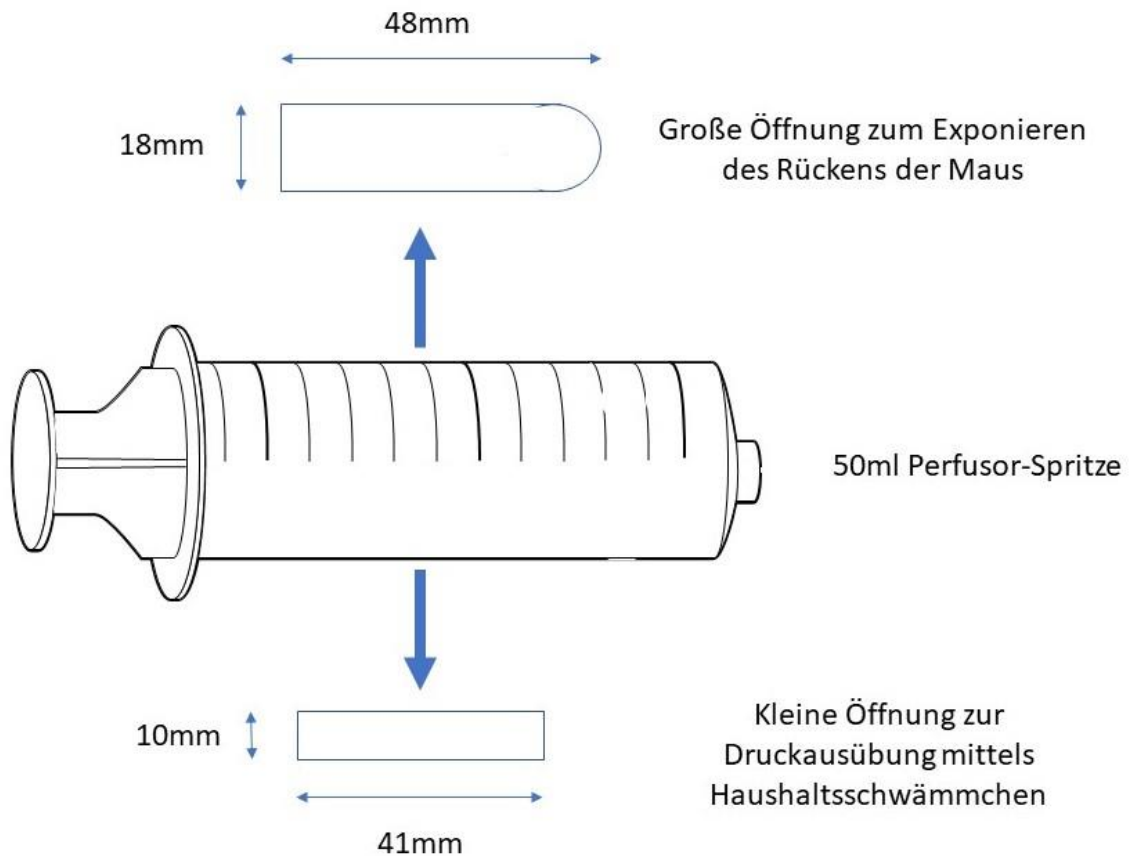


Abbildung 3: Präparation 50ml-Perfusorspritze für Verbrennungstrauma. Die Abbildung zeigt die Präparation der Spritze zur Durchführung des Verbrennungstraumas. Es wurden gegenüberliegend eine große und eine kleinere Öffnung in eine 50ml Perfusorspritze geschnitten. Die später für das Experiment in die Spritze eingeführte Maus, wurde mit dem rasierten Rücken Richtung großer Öffnung platziert, so dass dieser gegenüber 90° C heißem Wasser exponiert war. Die kleinere Öffnung auf der gegenüberliegenden Seite diente dazu mittels eines Schwämmchens die Maus organschonend gegen die große Öffnung zu pressen. Damit konnte kein Wasser neben dem exponierten Rücken in die Spritze eindringen. Der Spritzenzylinder wurde von hinten mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Spritzendüse wurde zur suffizienten Atmung der Maus offengelassen.

In einem Wasserbecken befindliches Wasser wurde schließlich auf 90°C erhitzt und die Temperatur mit einem Thermometer kontrolliert. Die präparierte Spritze, mit der darin befindlichen Maus, wurde in das Wasserbecken getaucht. Dies geschah so, dass sich der exponierte Teil des Rückens vollständig unterhalb der Wasseroberfläche des 90°C heißen Wassers befand, die Spritzendüse jedoch oberhalb blieb. Nach einer Expositionszeit von 9 Sekunden wurde die Spritze aus dem Wasserbecken herausgehoben, der Gummistopfen entfernt und die Maus entnommen. Großflächige Verbrennungen gehen mit einem hohen Wasserverlust des Gewebes einher. Um einen akuten Tod der Mäuse durch diesen Effekt zu verhindern,

wurde den Mäusen direkt nach der Traumainduktion 1ml einer 0,9%iger Kochsalzlösung i.p. verabreicht. Der zeitliche Ablauf ist in folgender Abbildung 4 dargestellt:

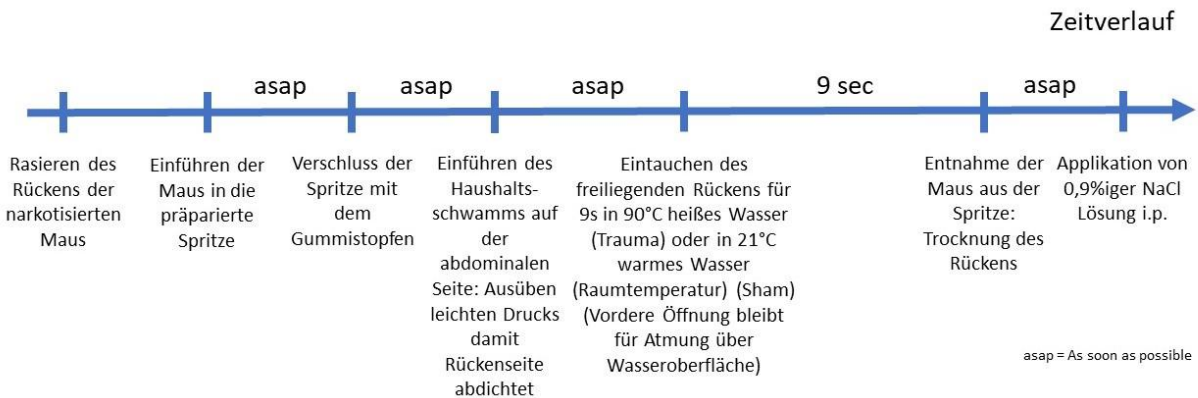


Abbildung 4: Zeitverlauf Scheinintervention und Verbrennungstrauma. Auf diesem Zeitstrahl ist der Ablauf der Scheinintervention (sham-Verfahren) sowie der Traumaintervention (burn-Verfahren) dargestellt.

5.7.4 Scheinintervention

Die Scheinintervention (sham-Verfahren) wurde, bis auf eine Abweichung, exakt so durchgeführt, wie die Traumainduktion durch Verbrennung. Der einzige Unterschied bestand darin, dass das Wasser eine Temperatur von 21°C besaß. Alle anderen Prozeduren (Narkose, Rasur, Einführung in die präparierte Spritze, Länge der Wasserexposition, Applikation der Kochsalzlösung) erfolgten exakt wie in im vorhergehenden Abschnitt (5.7.3) beschrieben.

5.7.5 Euthanasie

Nach Abschluss der Beobachtungszeiträume (je nach Versuchsgruppe 2 Stunden oder 7 Tage) wurden die Tiere mittels CO₂ Insufflation in Narkose getötet. Dazu wurden die Tiere in einen abgeschlossenen Plastikbehälter gesetzt und anschließend CO₂ eingeleitet. Die Tiere wurden dort bis zum Tod belassen und anschließend der vollständige Kreislaufstillstand überprüft.

5.8 Zellgewinnung

Um die Aktivierungsparameter der CD4⁺ Tregs messen zu können wurden in den Experimenten die regional drainierenden Lymphknoten entnommen. Dies geschah, um die Aktivität der lokalen CD4⁺ Tregs zu erfassen. Ebenso wurde die Milz entnommen, um die Aktivität der systemisch zirkulierenden CD4⁺ Tregs messen zu können. Damit keine artifizielle Aktivierung der immunologischen Zellen erfolgte, wurden diese direkt nach Euthanasie gewonnen und kalt gelagert. Zuerst wurde mittels Punktion des Herzens von

kaudal unterhalb des Rippenbogens kardial Blut entnommen und sofort anschließend die oben genannten Organe. Lymphknoten und Milz wurden nach der Entnahme in 1-4°C kaltem C5 Kulturmedium aufbewahrt.

5.8.1 Chirurgische Technik

Die Mäuse wurden auf einer Styroporplatte mit Kanülen an den Extremitäten fixiert und die Haut mit einem medianen Schnitt eröffnet, ohne die Bauchhöhle zu eröffnen. Anschließend wurden entlastende Hautschnitte an allen vier Extremitäten gesetzt. Diese führten von den jeweils am nächsten liegenden Enden des medianen Schnitts, bis zur jeweiligen Pfote. Anschließend wurden rechts und links die entstandenen Hautlappen stumpf vom darunterliegenden Gewebe getrennt und nach außen aufgespannt. Die den Rücken drainierenden Lymphknoten befinden sich inguinal, brachial und axillar [138]. Sie wurden aufgesucht, freipräpariert, entnommen und in 1-4°C kaltem C5 Kulturmedium gelagert. Nach Gewinnung der Lymphknoten wurde links, abdominal, lateral die Bauchhöhle mit einem ca. 1cm langen Schnitt eröffnet. Die in diesem Bereich befindliche Milz wurde an ihrer kaudalen und kranialen Aufhängung, jeweils mit einer anatomischen Pinzette erfasst, atraumatisch entfernt und ebenfalls sofort in 1-4°C kaltem C5 Kulturmedium gelagert.

5.8.2 Zellisolierung

Um eine Zellsuspension aus den gewonnenen Organen herzustellen wurde das folgende Verfahren bei der Milz sowie den Lymphknoten durchgeführt. Die Organe wurden jeweils in einer Petrischale mithilfe des Gummistempels einer 20ml Spritze vorsichtig durch ein Metallsieb (\varnothing 0,45mm) gepresst, somit zerkleinert und zusammen mit C5 Kulturmedium in einem Eppendorf-Cup mit 5ml Fassungsvermögen gesammelt. Die Lösungen wurden mittels Zentrifugation bei 500 xg über 10min aufgereinigt. Die in der Milzsuspension vorhandenen Erythrozyten wurde durch den Einsatz von Lysepuffer bei 500 xg über 10min lysiert und die Suspension gereinigt. Die Viabilität der Zellen wurde durch C5 Kulturmedium gewährleistet. Die entstandenen Milz- und Lymphknotensuspensionen wurden im letzten Schritt durch ein Feinsieb (\varnothing 70 μ m) gelassen, um Gewebsrückstände zu entfernen. Die gesiebten, reinen Zellsuspensionen wurden in C5 Kulturmedium aufgefangen und für die Färbung auf 96-Well Platten, mit je 5×10^5 Zellen pro Well, verteilt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in standardisierten Zählfeldern unter dem Mikroskop bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit 0.15%em PFA fixiert.

5.9 Blutgewinnung

Um die Aktivierungsparameter der Thrombozyten sowie die Blutgerinnung messen zu können, wurde den Mäusen direkt nach der Euthanasie kardial Blut entnommen. Da eine Kühlung des Blutes zu einer Erythrozytenlyse geführt hätte, wurde hierauf verzichtet. Zur Antikoagulation wurde Vollblut direkt nach

der Entnahme mit einer Citratlösung antikoaguliert. Um eine artifizielle Aktivierung zu verhindern wurde die Thrombozytenfärbung innerhalb weniger Minuten nach der Entnahme durchgeführt.

5.9.1 Entnahmetechnik

Nach der Euthanasie wurde der Rippenbogen palpirt und kurz unterhalb eine 1ml Spritze mit einer 14G Kanüle von kaudal median in kranial-medianer Richtung unter leichtem Zug am Spritzenstempel eingeführt. Die Spritzen waren dabei mit einer Citratlösung versetzt um eine Antikoagulation sicher zu stellen. Sobald Blut einschoss wurde die Spritze nicht mehr bewegt und so viel Blut wie möglich gewonnen. Anschließend wurde dem entnommenen Vollblut, wenn nötig, zusätzliche Citratlösung zugefügt, um das optimale Verhältnis von Blut/Citratlösung von 10:1 zu erreichen.

5.10 Durchflusszytometrie

Das durchflusszytometrische Messverfahren eignet sich gut um Proteine oberflächlich oder intrazellulär nachzuweisen. Ist bei bestimmten Proteinen bekannt, dass sie nur oder verstärkt bei Aktivierung der Zelle exprimiert werden, so lassen sich anhand ihres Nachweises Aussagen über den Aktivitätsstatus der Zelle machen.

5.10.1 Durchflusszytometrie und Phospho-Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer werden Zellen in einer Spüllösung einzeln an den Detektionslasern vorbeigeführt. Die Laserstrahlen werden von den Zellen gestreut. Anhand des Streulichts lassen sich Größe und Granularität der Zellen berechnen. Zusätzlich zur Streuung werden die anhängenden Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper durch die Laser angeregt, so dass ein Fluoreszenzlicht entsteht. Anhand der Wellenlänge dieses Lichts lassen sich die markierten Oberflächenproteine bestimmen. Es können somit quantitative Aussagen über die Anzahl, Größe, Granularität und Expression der Oberflächenproteine getroffen werden [139].

Bei der hier verwendeten Phospho-Durchflusszytometrie wurden intrazelluläre Proteine und deren phosphorylierte Form quantitativ gemessen. Es wurden die Signaltransduktionsfaktoren ZAP-70 und PKC- θ und deren phosphorylierte Form pZAP-70 und pPKC- θ gemessen. Damit konnte zwischen der aktivierten und der inaktiven Form des Moleküls unterschieden werden.

5.10.2 Färbung der CD4+ non-Tregs/ CD4+ Tregs und der Aktivierungsparameter

Zur Identifikation der CD4+ Tregs wurden der CD4-Rezeptor und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 gewählt. Je nach Beobachtungsdauer wurden unterschiedliche Aktivierungsparameter gewählt.

Für die Versuchsgruppen mit einer Beobachtungslänge von 2 Stunden wurden intrazelluläre Signalmoleküle (ZAP-70 und PKC- θ), sowie deren phosphorylierte Form gewählt (pZAP-70 und pPKC- θ) [140-142].

Für die Versuchsgruppen mit einer Beobachtungslänge von 7 Tagen wurden Oberflächenproteine als Aktivierungsparameter gewählt: CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-RII [143-147]. Diese sind in vielen Studien als Aktivierungsparameter verwendet und gelten daher als etabliert. Alle Parameter werden nach Aktivierung der CD4+ Tregs vermehrt exprimiert.

Für die phospho-durchflusszytometrische Messung der 2-Stunden-Versuchsgruppen wurden die Zellen wie folgt oberflächlich sowie intrazellulär mit Antikörpern gefärbt. Die fixierten Zellen wurden mit PBA gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert und permeabilisiert. Daraufhin wurden sie erneut gewaschen und der Fc-Block wurde durchgeführt, indem mit anti-CD16/32 inkubiert wurde. Dieser verhindert die unspezifische Bindung färbender Antikörper über die Fc-Domäne. Es wurden im Folgenden Antikörper zur Identifikation der Zellen zugegeben (anti-CD4, anti-FoxP3), diese wurden ausgewählt mit einem konjugierten Fluorochrom. Die intrazellulären Signalmoleküle in nativer und phosphorylierter Form wurden mit unkonjugierten Antikörpern detektiert (anti-(p)ZAP, anti-(p)PKC). Nach ausreichender Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und der sekundäre intrazelluläre Antikörper (Alexa Fluor 555) dazu gegeben. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Zellen ein letztes Mal gewaschen und final mit 0,3%igem PFA fixiert.

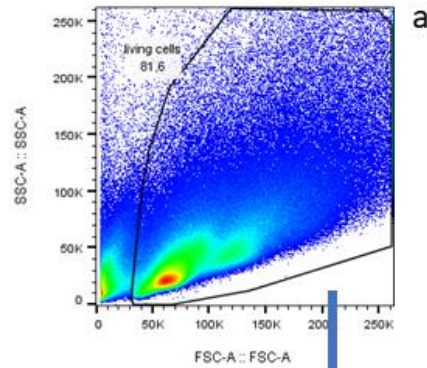
Für die durchflusszytometrische Messung der 7-Tages-Versuchsgruppen wurde das Färbeprotokoll geringgradig modifiziert. Die Identifizierung der Zellen erfolgte in Analogie zu o.g. Experimenten durch Zugabe von anti-CD4 und anti-FoxP3 Antikörpern. Als Aktivierungsparameter wurden die oberflächlichen Moleküle CD44, CD69, CD62-L, GITR und TNF-RII parallel mit entsprechenden Antikörpern angefärbt.

5.10.3 Gating Strategie CD4+ Tregs

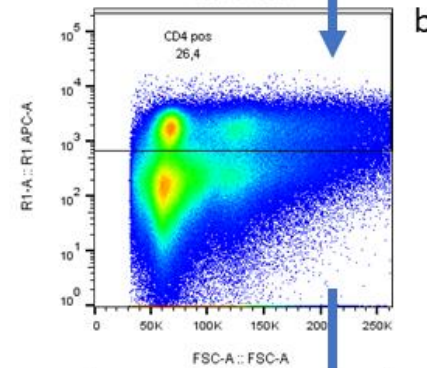
Zu Beginn des Gating-Prozesses wurde im Forward- und Side Scatter (FSC & SSC) kleinteiliges Zell-Debris identifiziert, das Live-Gate wurde erstellt. Über das Fluorochrom APC wurden CD4+ T-Zellen identifiziert, es wurde ein entsprechendes Gate gezogen um diese Population zu identifizieren. Innerhalb der Population der CD4+ T-Zellen wurde durch Gating die FITC-high Population der CD4+FoxP3+Tregs identifiziert. Entsprechend konnte zwischen der FITC-low Population CD4+FoxP3-non-Tregs unterschieden werden. Die Populationen CD4+ Tregs und CD4+ non-Tregs wurden entsprechend ihrer Aktivierungsparameter untersucht, dieses wurde durch selektives Gating für PE in den Populationen durchgeführt. Über Histogramme konnte eine quantitative Auswertung durchgeführt werden. Da die

Aktivierungsparameter im Rahmen der Screening Studie mit demselben Fluorochrom angefärbt wurden, wurden die Untersuchungen in unterschiedlichen Wells durchgeführt. Die Gating Strategie ist in der folgenden Abbildung 5 visualisiert.

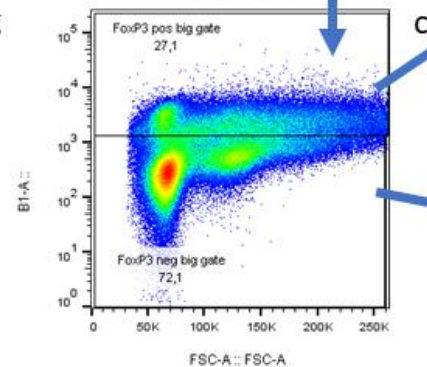
Gating: Unterscheiden lebender Zellen von Zelldebris



Gating: CD4+T-Zellen



Gating: Unterscheidung CD4+FoxP3+Tregs von CD4+FoxP3- T-Effektor-Zellen



Histogramm: Expression der Aktivierungsmarker (berechnen des Median)

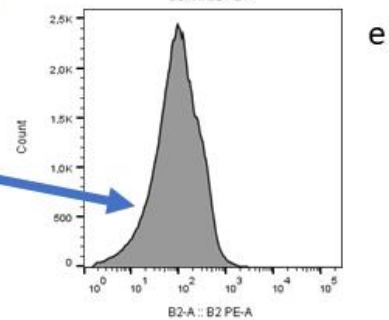
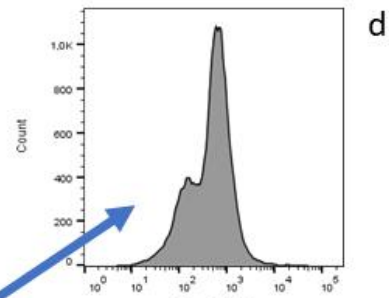


Abbildung 5: Gating Strategie CD4+ Tregs. Exemplarisch dargestellt ist die Gating Strategie der CD4+FoxP3+Tregs. Es wurden anhand von Forward (FSC-A) und Side Scatter (SSC-A) die lebenden Zellen vom Zelldebris unterschieden (a). Anschließend wurden anhand der Fluoreszenz die CD4 positiven Zellen identifiziert (Fluorochrom APC) (b). Innerhalb der Population der CD4+ T-Zellen wurden die FoxP3 positiven und negativen Zellen identifiziert (Fluorochrom FITC) (c). Sowohl von den FoxP3 positiven (CD4+ Tregs) als auch von den FoxP3 negativen Zellen (T-Effektor Zellen/CD4+ non-Tregs) wurden die jeweiligen Aktivierungsparameter als Histogramm dargestellt (Fluorochrom PE) (d,e).

5.10.4 Aktivierung von CD4+ Tregs mittels CD3ε

Um einen Positivnachweis für die Färbemethode zu erbringen, wurden die CD4+ Tregs mit einem Antikörper gegen CD3ε, einem ein Teil des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex [136], in Konzentrationen von 0µg/ml, 0,01µg/ml, 0,1µg/ml und 1µg/ml für 60 min stimuliert. Die veränderte Expression der intrazellulären Signalmoleküle und deren phosphorylierte Form ((p)ZAP-70 und (p)PKC-θ), sowie der Oberflächenproteine CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-RII wurde anschließend gemessen. Dabei wurde für die Färbung wie in 5.10.2 und 5.10.3 beschrieben verfahren. So konnte ein valides Färbeprotokoll der Aktivierungsparameter nachgewiesen werden.

5.10.5 AK-Färbung der Thrombozyten und Aktivierungsparameter

Zur Identifikation der Thrombozyten wurde der CD41-Rezeptor gewählt. Als Parameter für die Thrombozytenaktivierung wurden CD62P, CD63 und Toll-like-Rezeptor 9 (CD289) ausgewertet [94, 95, 148].

Die Antikörperfärbung der Thrombozyten innerhalb der Blutproben wurde wie folgt durchgeführt. Die Vollblutproben wurden mit einer 1%en PFA Lösung fixiert, anschließend mit PBA gewaschen und die färbenden Antikörper zugeführt und für 45min inkubiert. Nach dem Färbvorgang wurde die Lyse der Erythrozyten durchgeführt mittels Applikation von Lysepuffer für 10min. Die Erythrozytenreste wurden schließlich ausgewaschen und die Messung im Durchflusszytometer direkt durchgeführt.

5.10.6 Gating Strategie Thrombozyten

Es wurde zunächst anhand von FSC und SSC ein Live-Gate erstellt, Zell-Debris wurde ausgeschlossen. Anschließend wurden anhand von CD41 mit Farbmarkierung VioBlue alle Thrombozyten identifiziert und ein Thrombozyten-Gate erstellt. Innerhalb dieses Gates wurden nun mittels Fluorochrom APC (CD62P), Fluorochrom PE (CD63) und Fluorochrom FITC (TLR-9) die Aktivierungsparameter dargestellt. Im Histogramm wurde der Median dabei als quantitativer Wert für die Auswertung verwendet. Exemplarisch ist die Gating Strategie in folgender Abbildung 6 dargestellt.

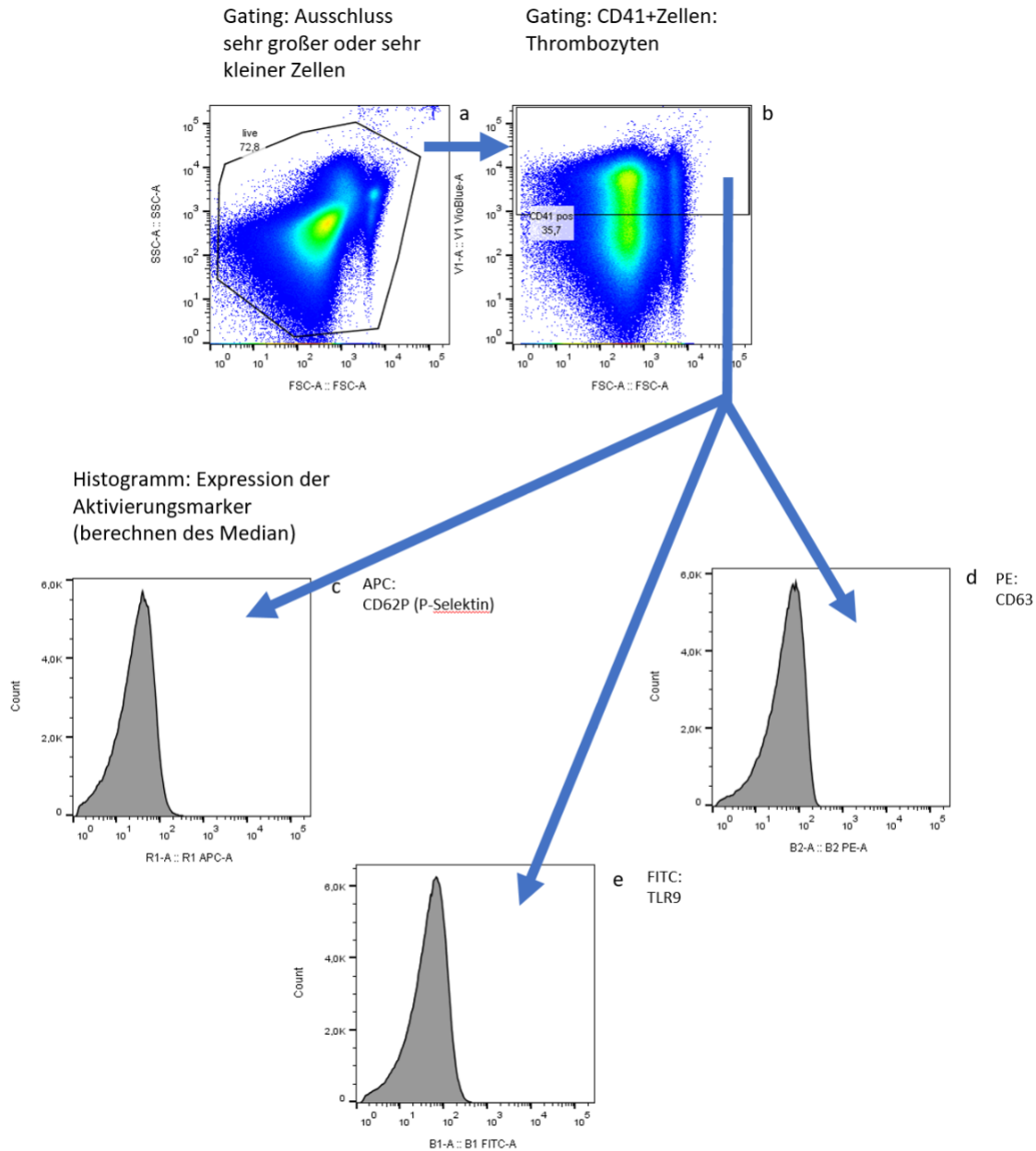


Abbildung 6: Gating Strategie Thrombozyten. Exemplarisch dargestellt ist die Gating Strategie der Thrombozyten. Es wurden anhand von Forward (FSC-A) und Side Scatter (SSC-A) die lebenden Zellen vom Zell-Debris und den Zellen, die sich in der Größe deutlich von Thrombozyten unterscheiden, unterschieden (a). Anschließend wurde anhand der Fluoreszenzmarkierung des Oberflächenmarkers CD41 die Thrombozytenpopulation identifiziert, das Fluorochrom ViobBlue wurde verwendet (b). Im nächsten Schritt wurde die Expression der Aktivierungsparameter der Thrombozyten als Histogramme dargestellt (P-Selektin, APC gefärbt: c, CD63, PE gefärbt: d, TLR9, FITC gefärbt: e).

5.10.7 Aktivierung von Thrombozyten mittels Thrombin

Mit dem Ziel des Positivnachweises für die Färbemethode wurden die Thrombozyten mit Thrombin (0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, für jeweils 4 min) stimuliert, um die veränderte Expression von CD62P, CD63 und TLR-9 zu

messen. Dazu wurden 6-8 Wochen alten männlichen C57BL6/N Mäusen (n=3) Vollblut entnommen, durch Zentrifugation des Blutes bei 190 ×g über 10min und Abpipettieren des Überstandes wurde Plättchenreiches Plasma hergestellt. Dieses wurde mit Thrombin in den Konzentrationen 0-100µM für 4 min stimuliert. Zur Identifikation der Thrombozyten wurde der CD41-Rezeptor gewählt und als Parameter für die Thrombozytenaktivierung in den späteren Experimenten CD62P, CD63, sowie der Toll-like-Rezeptor 9 (CD289) [94, 95, 148]. Die hier genannte Stimulation diente der Positivkontrolle der Färbung der Aktivierungsparameter. Es ist bekannt, dass die Stimulation von Thrombozyten durch Thrombin zur erhöhten Expression von P-Selektin [149] und CD63 [150] führt. Bezüglich des TLR-9 Rezeptors ist bis dato nicht bekannt, welcher Stimulationsmechanismus zu einer verstärkten Expression führt. Daher wurde in diesem Fall keine Positivkontrolle mit Thrombin bezüglich der TLR9 Expression durchgeführt. Wie in 5.10.5 und 5.10.6 beschrieben wurde dann die Färbung und Analyse der Thrombozyten durchgeführt.

5.11 Thromboelastometrie

Aktivitätsänderungen von Thrombozyten spiegeln sich in einem veränderten Verhalten in der Gerinnung wider. Die Thromboelastometrie gibt einen globalen Überblick über die Gerinnung, ist schnell durchführbar und klinisch, sowie im Mausmodell, bereits etabliert.

5.11.1 Funktionsprinzip Thromboelastometrie

Vollblut wird in einen kleinen Plastik-Cup gegeben, wie in 5.11.2 beschrieben rekalkifiziert und mithilfe von Tissue Factor die Gerinnung aktiviert. Der Cup wird sofort auf die am ROTEM®-Messgerät magnetisch zu befestigenden Halterungen eingeführt. Diese Halterung wird magnetisch an das ROTEM®-Messgerät befestigt, so dass ein Plastikstift in der Blutprobe im Wechsel nach rechts und links oszilliert. Die Bewegung des Stifts wird durch die einsetzende Gerinnung gebremst. Die Änderung der Bewegung wird auf einen Graphen übertragen und lässt Aussagen über die Festigkeit des Gerinnsels und die Schnelligkeit der Gerinnelsbildung zu.

5.11.2 Durchführung Thromboelastometrie mit ROTEM® delta und Cup&Pin mini®

Die Durchführung der thromboelastometrischen Messung mit ROTEM® delta und Cup&Pin mini® erfolgte wie bei der Messung humaner Proben, nur mit kleineren Mengen (105µl). Zu Beginn wurden die Pins mini® auf den Messstab aufgesteckt und die Cups mini® in die Küvettenhalter. Anschließend wurden von Hand star-tem® (Rekalkifizierung) und ex-tem® (Extrinsische Gerinnungsaktivierung mit Tissue Factor) (jeweils 7µl) in den Cup mini® pipettiert. Danach wurde das citrierte Vollblut (105µl) hinein pipettiert, der Cup mini® sofort auf die Messeinheit aufgesteckt und die Messung unverzüglich von Hand gestartet.

5.12 Versuchsaufbau

5.12.1 A: Werden CD4+ Tregs posttraumatisch schneller aktiviert als CD4+ non-Tregs?

Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob sich die Aktivierung der CD4+ Tregs und die der CD4+ non-Tregs (alle anderen CD4+ T-Zellen) in der frühen posttraumatischen Phase unterscheiden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass CD4+ Tregs posttraumatisch sehr schnell aktiviert werden [151, 152]. Um die Fragestellung zu beantworten, wurden innerhalb zweier 2-Stunden-Versuchsgruppen die Aktivierung der CD4+ Tregs und die der CD4+ non-Tregs posttraumatisch verglichen. Die Kinetik der Zellaktivierung wurde in den Kontrollgruppen der unten genannten Experimente analysiert, um Synergieeffekte auszunutzen und Tiere einzusparen. In beiden Versuchsgruppen wurden die nicht-depletierenden Isotypkontrollen (Thrombozytendepletions-Isotypkontrollserum und HRPN) appliziert (vergleiche unten genannte Experimente) und das Verbrennungstrauma induziert (burn-Gruppen). Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten, sowie der Milz entnommen und als Aktivierungsparameter (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ gewählt.

Tabelle 8: Versuchsgruppen und Versuchsablauf A

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten- Depletion	n=9
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrolle Treg-Depletion (HRPN)	n=9

Der Versuchsablauf stellte sich wie folgt dar. In der ersten Versuchsgruppe wurden männlichen C57BL/6N Mäusen (siehe Tabelle 8), wie in 5.6.1 beschrieben, das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) verabreicht. 2 Stunden später wurde bei den Tieren, nach vorheriger Präparation (5.7.2), ein Verbrennungstrauma unter Narkose induziert (5.7.3). Die in Narkose belassenen Tiere wurden posttraumatisch nach 2 Stunden euthanasiert (5.7.5) und die benannten Organe entnommen (5.8.1), die Zellen gefärbt (5.10.2) und analysiert (5.10.3). Das Vorgehen der zweiten Versuchsgruppe entsprach dem der ersten, nur wurden bereits 72 Stunden vor Traumainduktion der Isotypkontrollantikörper HRPN (Treg-Depletion- Kontrolle) appliziert (5.6.2). Der restliche Ablauf entspricht dem der ersten Gruppe.

Der zeitliche Ablauf ist auf dem folgenden Zeitstrahl in Abbildung 7 dargestellt:

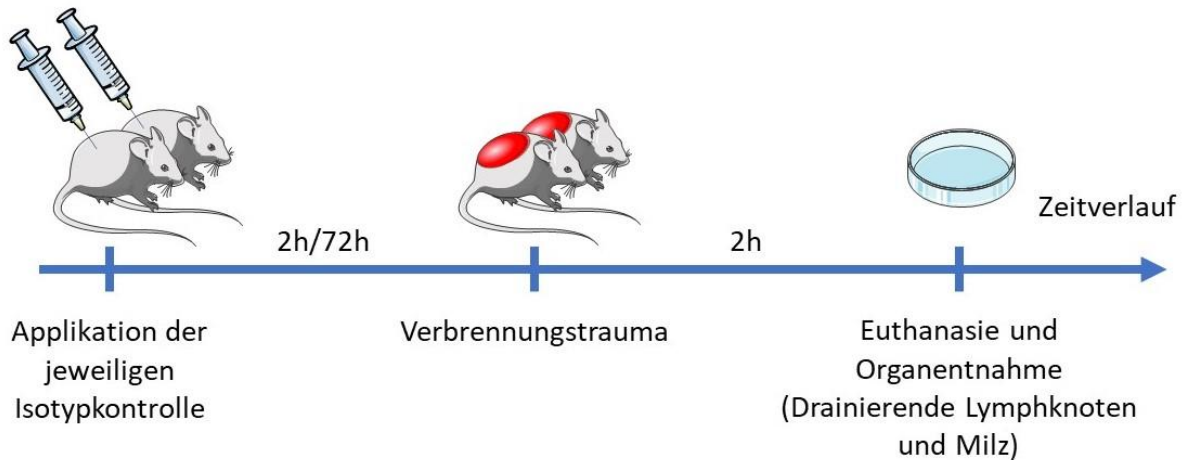


Abbildung 7: Zeitverlauf Versuchsaufbau A. Männlichen C57BL/6N Mäusen wurde entweder das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) oder der Isotypkontrollantikörper HRPN (CD4+ Treg-Depletion - Kontrolle) verabreicht. 2 Stunden beziehungsweise 72 Stunden später wurde bei den Tieren ein Verbrennungstrauma induziert. Die Tiere, wurden posttraumatisch nach 2 Stunden euthanasiert und die drainierenden Lymphknoten sowie die Milz zur Analyse entnommen.

5.12.2 B: Modulieren Thrombozyten die frühe posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?

Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Um beantworten zu können, ob Thrombozyten die frühe posttraumatische Aktivität von CD4+ Tregs modulieren, wurden in zwei Versuchsgruppen die Thrombozyten >90% depletiert. Anschließend wurde entweder eine Scheinintervention (sham-Gruppe) oder eine Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppe) durchgeführt. Sollte die posttraumatische Aktivierung der CD4+ Tregs durch Thrombozyten moduliert sein, so verhält sich das Ausmaß der Aktivierung bei vollständiger Abwesenheit der Thrombozyten anders. Um unspezifische Antikörper-Wirkungen ausschließen zu können wurde in zwei weiteren Versuchsgruppen ein Isotypkontrollserum appliziert. In diesen Gruppen wurde ebenfalls entweder eine Scheinintervention (sham-Gruppe) oder die Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppe) durchgeführt. Analysiert wurde in allen Gruppen jeweils die posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs der drainierenden Lymphknoten sowie der Milz. Dieses erlaubte die lokale (drainierende Lymphknoten) und die systemische (Milz) Aktivierung der CD4+ Tregs zu unterscheiden. Als Aktivierungsparameter wurden (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ gewählt.

Tabelle 9: Versuchsgruppen und Versuchsablauf B

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten- Depletion	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten- Depletion	n=9

Der Versuchsablauf stellte sich wie folgt dar. In allen Versuchsgruppen wurden männlichen C57BL/6N Mäusen (siehe Tabelle 9), wie in 5.6.1 beschrieben, entweder das Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum oder das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) verabreicht. Zwei Stunden später wurde bei den Tieren, nach vorheriger Präparation (5.7.2), entweder eine Scheinintervention (5.7.4) oder ein Verbrennungstrauma unter Narkose (5.7.3) induziert. Die in Narkose belassenen Tiere wurden posttraumatisch nach 2 Stunden euthanasiert (5.7.5) und die benannten Organe entnommen (5.8.1), die Zellen gefärbt (5.10.2) und analysiert (5.10.3).

Der zeitliche Ablauf ist auf dem folgenden Zeitstrahl in Abbildung 8 dargestellt:

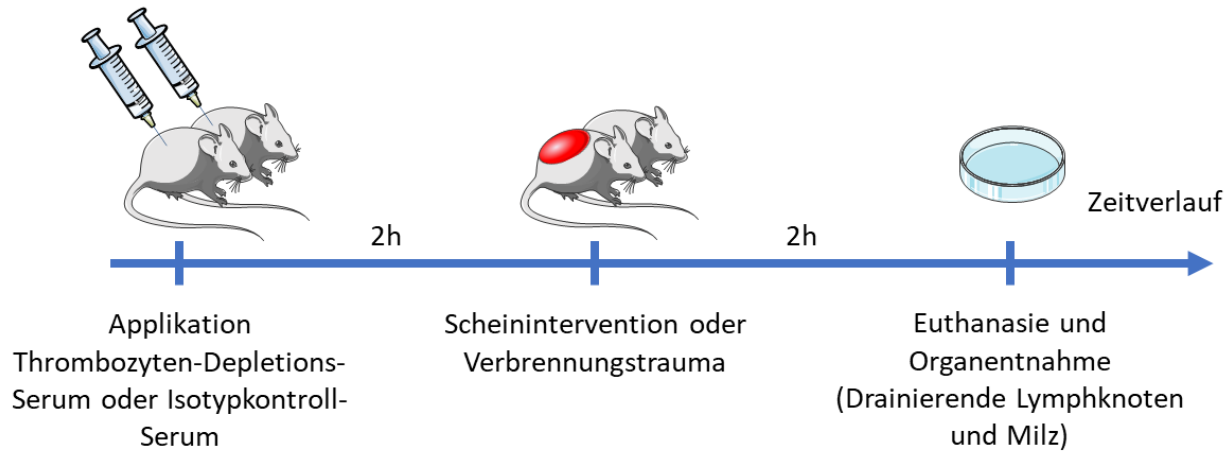


Abbildung 8: Zeitverlauf Versuchsaufbau B. Männlichen C57BL/6N Mäusen wurde entweder das Thrombozyten-Depletionsserum oder das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) verabreicht. 2 Stunden später wurde bei den Tieren ein Verbrennungstrauma oder eine Scheinintervention induziert. Die Tiere, wurden posttraumatisch nach 2 Stunden euthanasiert und die drainierenden Lymphknoten sowie die Milz zur Analyse entnommen.

5.12.3 C: Modulieren Thrombozyten die späte posttraumatische Immunantwort der CD4+ Tregs?

Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Diese Forschungsfrage ist ähnlich der zweiten (B), nur dass sie sich auf die späte posttraumatische Phase bezieht. Um sie zu beantworten, wurden analog der Versuche zur Klärung der vorangegangenen Forschungsfrage in zwei Versuchsgruppen die Thrombozyten nahezu vollständig depletiert. Anschließend wurde entweder eine Scheinintervention (sham-Gruppe) oder die Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppe) durchgeführt. Zur Kontrolle potentieller unerwünschter Aktivierung durch den Depletionsantikörper wurde ebenfalls in zwei weiteren Versuchsgruppen ein Isotypkontrollserum appliziert. In diesen Kontrollgruppen wurde wiederum entweder eine Scheinintervention (sham-Gruppe) oder die Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppe) durchgeführt. Analysiert wurde in allen Gruppen ebenfalls wieder jeweils die posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs der drainierenden Lymphknoten sowie der Milz. Die lokale (drainierenden Lymphknoten) und die systemische (Milz) Aktivierung der CD4+ Tregs konnte so unterschieden werden. Als Parameter der späten Aktivierung wurden CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-RII gewählt [143-147].

Tabelle 10: Versuchsgruppen und Versuchsablauf C

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten- Depletion	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	Isotypkontrollserum Thrombozyten- Depletion	n=9

Der Versuchsablauf stellte sich wie folgt dar. In allen Versuchsgruppen wurden männlichen C57BL/6N Mäusen (siehe Tabelle 10), wie in 5.6.1 beschrieben, entweder das Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum oder das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) verabreicht. Zwei Stunden später wurde bei den Tieren, nach vorheriger Präparation (5.7.2), entweder eine Scheinintervention (5.7.4) oder ein Verbrennungstrauma unter Narkose (5.7.3) induziert. Die Tiere wurden nach der Trauma-induktion (5.7.3) postoperativ analgetisch behandelt und kontrolliert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere euthanasiert (5.7.5), die entsprechenden Lymphknoten und die Milz entnommen (5.8.1), die Zellen gefärbt (5.10.2) und analysiert (5.10.3).

Der zeitliche Ablauf ist auf dem folgenden Zeitstrahl in Abbildung 9 dargestellt:

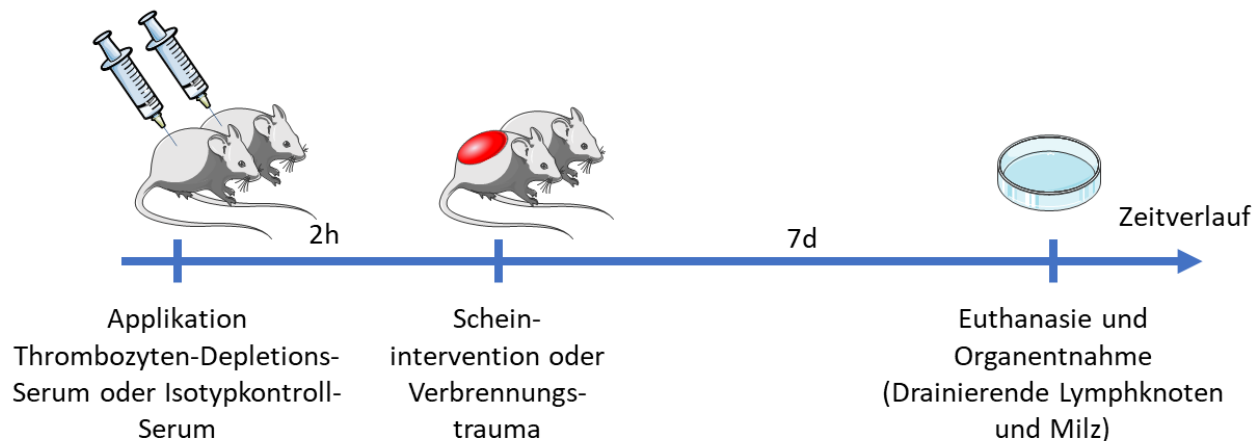


Abbildung 9: Zeitverlauf Versuchsaufbau C. Männlichen C57BL/6N Mäusen wurde entweder das Thrombozyten-Depletionsserum oder das Isotypkontrollserum (Thrombozytendepletion-Kontrolle) verabreicht. Zwei Stunden später wurde bei den Tieren ein Verbrennungstrauma oder eine Scheinintervention induziert. Die Tiere, wurden posttraumatisch nach 7 Tagen euthanasiert und die drainierenden Lymphknoten sowie die Milz zur Analyse entnommen.

5.12.4 D: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten?

Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Entsprechend der Forschungsfrage, ob Thrombozyten die posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs beeinflussen, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt reziprok zu beobachten ist. Dazu wurde mit derselben Vorstellung wie bei Forschungsfrage B und C vorgegangen. Der betreffende Zelltyp, dieses Mal CD4+ Tregs, wurde in zwei Gruppen depletiert. Dabei wurde ein anti-CD25-Antikörper (PC-61) verwendet, da CD25 auf den CD4+ Tregs sehr hoch exprimiert ist und eine direkte Depletion des Transkriptionsfaktors FoxP3 aufgrund der intranukleären Lokalisation mittels Antikörper nicht möglich ist. Anschließend wurde eine Scheinintervention (sham-Gruppe) oder ein Verbrennungstrauma (burn-Gruppe) induziert. Die Aktivität des potentiell interagierenden Zelltyps, hier der Thrombozyten, wurde im Vergleich zu den nicht-depletierten Gruppen gemessen. Um vergleichen zu können und potentielle artifizielle Aktivierungen auszuschließen, wurden in zwei weiteren Versuchsgruppen ein Isotypkontrollantikörper appliziert. Entsprechend der Depletionsgruppen wurden auch hier wieder eine Scheinintervention (sham-Gruppe) und eine Induktion des Verbrennungstraumas (burn-Gruppe) durchgeführt. Analysiert wurde in allen Gruppen die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten im kardial entnommenen Blut. Anders als bei den CD4+ Tregs gibt es bei den Thrombozyten keine etablierten Parameter, die eine immunologische

Aktivierung anzeigen. Es wurden CD62P (P-Selektin), CD63 und CD289 (TLR-9) als Aktivierungsparameter gewählt. Im Vergleich der sham-Gruppe und burn-Gruppe der Isotypkontrollantikörpergruppen konnte untersucht werden, wie sich die Aktivierung nach Induktion des Traumas ändert. Im Vergleich der sham-Gruppen der CD4+ Treg-Depletionsgruppen und der Isotypkontrollantikörpergruppen konnte untersucht werden, ob der verwendete Depletionsantikörper Einfluss auf die Grundaktivität nimmt. Im Vergleich der beiden burn-Gruppen der CD4+ Treg-Depletionsgruppen und der Isotypkontrollantikörpergruppen konnte untersucht werden, ob CD4+ Tregs Einfluss auf die späte posttraumatische Aktivierung der Thrombozyten nehmen.

Tabelle 11: Versuchsgruppen und Versuchsablauf D

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender- Antikörper	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender- Antikörper	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	HRPN (Isotypkontrolle zu PC-61)	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	HRPN (Isotypkontrolle zu PC-61)	n=9

Der Versuchsablauf stellte sich wie folgt dar. In allen Versuchsgruppen wurden männlichen C57BL/6N Mäusen (siehe Tabelle 11), wie in 5.6.2 beschrieben, entweder der CD4+ Treg-Depletions-Antikörper (PC-61) oder der Isotypkontrollantikörper (HRPN) verabreicht. 72 Stunden später wurde bei den Tieren, nach vorheriger Präparation (5.7.2), entweder eine Scheinintervention (5.7.4) oder ein Verbrennungstrauma unter Narkose (5.7.3) induziert. Die Tiere der 2-Stunden-Versuchsgruppen wurden in Narkose belassen und nach 2 Stunden euthanasiert (5.7.5), Blut kardial entnommen (5.9.1), die Thrombozyten gefärbt (5.10.5) und analysiert (5.10.6). Die Tiere der 7-Tages-Versuchsgruppen wurden nach der Traumainduktion, wie in 5.7.1 beschrieben, postoperativ analgetisch behandelt und kontrolliert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere euthanasiert (5.7.5), durch kardiale Entnahme Blut gewonnen (5.9.1), die Thrombozyten gefärbt (5.10.5) und analysiert (5.10.6).

Der zeitliche Ablauf für die frühe posttraumatische Phase ist auf dem folgenden Zeitstrahl in Abbildung 10 dargestellt:

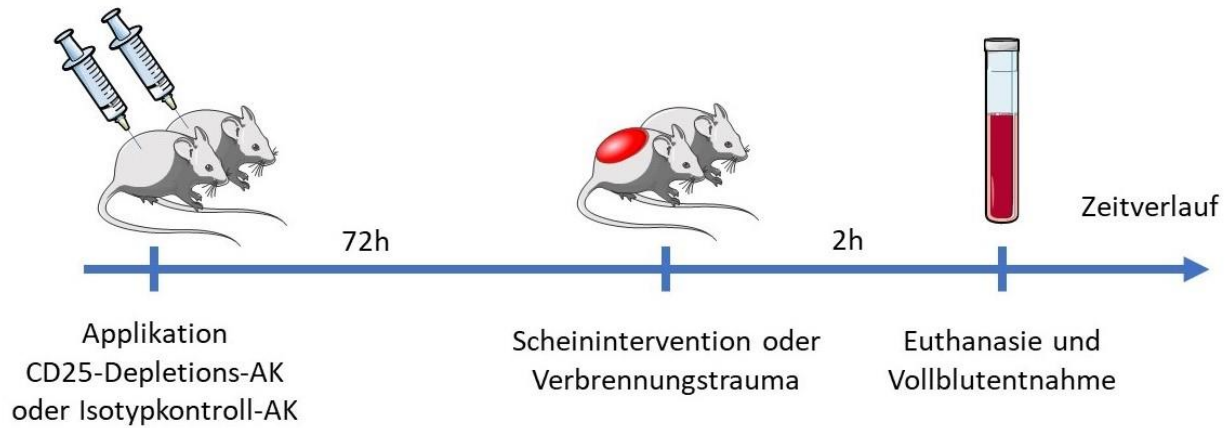


Abbildung 10: Zeitverlauf Versuchsaufbau D: Frühe posttraumatische Phase. Männlichen C57BL/6N Mäusen wurde entweder der CD25-Depletionsantikörper (PC-61) oder der Isotypkontrollantikörper HRPN verabreicht. 72 Stunden später wurde bei den Tieren ein Verbrennungstrauma oder eine Scheinintervention induziert. Die Tiere wurden posttraumatisch nach 2 Stunden euthanasiert und Vollblut wurde über eine kardiale Punktion entnommen.

Der zeitliche Ablauf für die späte posttraumatische Phase ist auf dem folgenden Zeitstrahl in Abbildung 11 dargestellt:

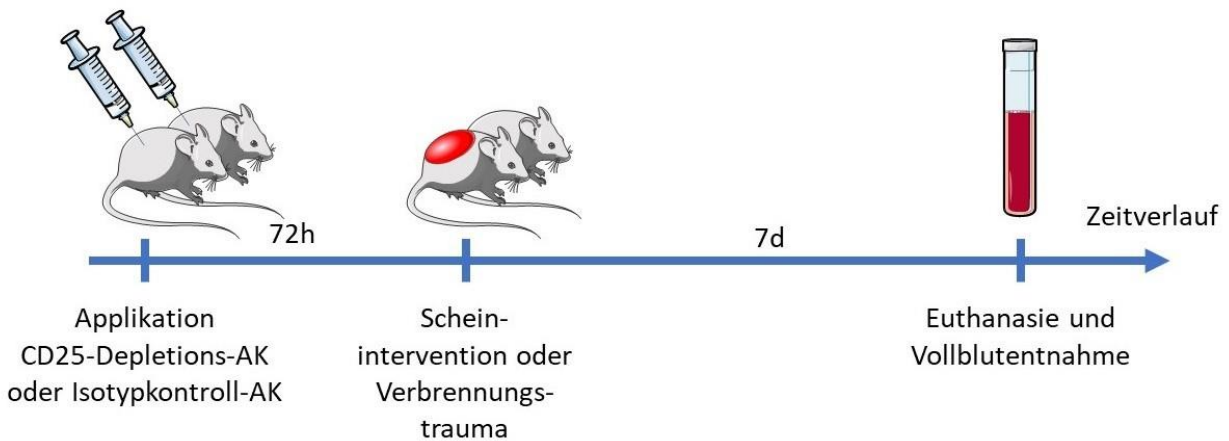


Abbildung 11: Zeitverlauf Versuchsaufbau D: Späte posttraumatische Phase. Männlichen C57BL/6N Mäusen wurde entweder der CD25-Depletionsantikörper (PC-61) oder der Isotypkontrollantikörper HRPN verabreicht. 72 Stunden später wurde bei den Tieren ein Verbrennungstrauma oder eine Scheinintervention induziert. Die Tiere, wurden posttraumatisch nach 7 Tagen euthanasiert und Vollblut wurde über eine kardiale Punktion entnommen.

5.12.5 E: Modulieren CD4+ Tregs die posttraumatische Hämostase?

Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Neben der Fragestellung ob bei der Depletion der CD4+ Tregs eine posttraumatische Änderung der Thrombozytenaktivität anhand der Aktivierungsparameter messbar ist, stellte sich die Frage, ob eine posttraumatische Änderung der Hämostase sichtbar ist. Um diese Forschungsfrage zu untersuchen, wurde wie in D beschrieben vorgegangen, wobei anstelle der Aktivierungsparameter auf den Thrombozyten die globale Gerinnung mittels Thromboelastometrie gemessen wurde. Es wurden dabei dieselben Gruppen wie in D beschrieben verglichen.

Tabelle 12: Versuchsgruppen und Versuchsablauf E

Versuchstiere	Intervention	Applikation	Gruppengröße
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender- Antikörper	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	PC-61 (anti-CD25) CD4+ Treg-depletierender- Antikörper	n=9
WT C57BL/6N	Scheinintervention (sham-Gruppe)	HRPN (Isotypkontrolle zu PC-61)	n=7
WT C57BL/6N	Verbrennung (burn-Gruppe)	HRPN (Isotypkontrolle zu PC-61)	n=9

Die für diesen Abschnitt verwendeten Mäuse sind in der Tabelle 12 eingetragen. Der Versuchsablauf entspricht dem in 5.12.4 (Forschungsfrage D). Die gewonnenen Blutproben wurden nur anschließend mittels dem thromboelastometrischen ROTEM® Messverfahren (5.11.2) analysiert.

5.13 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die zu analysierenden Gruppen waren unverbundenen, so dass mit diesem Test verglichen werden konnte, ob die Abweichung der Werte als zufällig angesehen werden kann oder nicht. Dabei wurden Unterschiede mit einem $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander wurde der Dunn's-Test durchgeführt. Es wurde die GraphPad Prism Software Version 6.05 von GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA) verwendet. Median \pm Q1 und Q3 Werte sind für die Box Plots angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Nachweis der Funktionalität der Methoden:

6.1.1 Antikörper-Depletion der Thrombozyten

Exemplarisch sind in der untenstehenden Abbildung 12 die Ergebnisse der Depletion dargestellt.

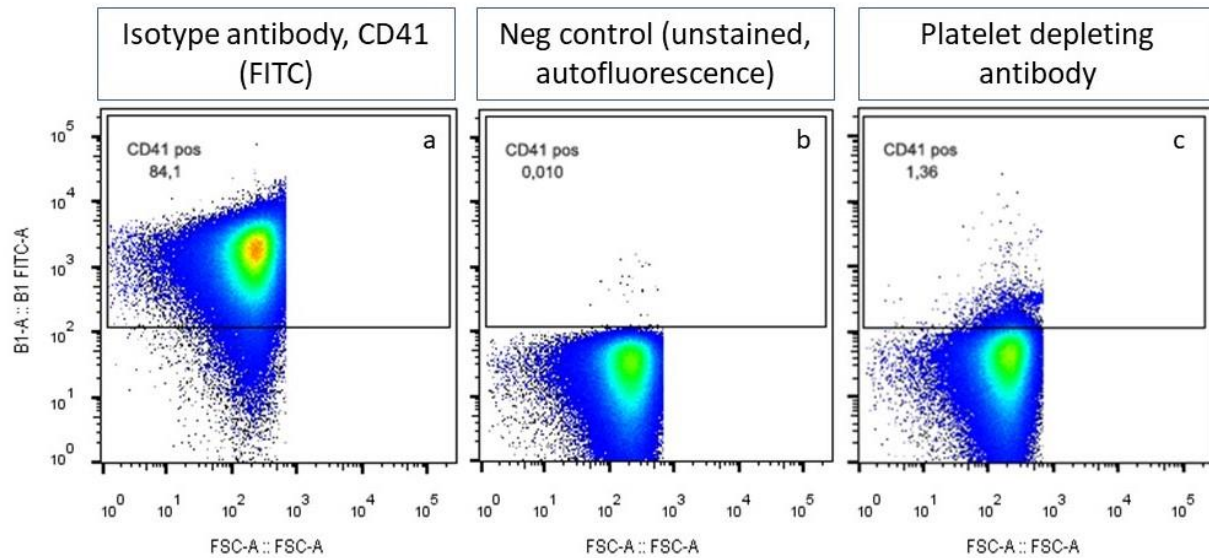


Abbildung 12: Nachweis Thrombozytendepletion. Zum Nachweis der depletierenden Wirkung des Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum in den Versuchstieren wurde Vollblut 2 Stunden nach *in vivo* Applikation entnommen und die Population der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ebenso wurde mit dem Isotypkontrollserum verfahren. In dieser Abbildung sind exemplarisch die Dot Plots des Vollblutes jeweils eines Tieres 2 Stunden nach der Applikation des entsprechenden Antikörpers dargestellt. Zum Vergleich ist ein Dot Plot ohne Färbung gezeigt (b). Die Applikation von Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum führt zu einer effektiven Depletion von >90% der Thrombozyten (c). Die Applikation des Isotypkontrollserum hat keine Depletion zur Folge (a). Zum Nachweis der Thrombozyten nach 2h wurde der CD41 Antikörper mit dem Fluorochrom FITC verwendet (a und c).

Exemplarisch sind in der untenstehenden Abbildung 13 die Ergebnisse der Depletion im Zeitverlauf über 4h dargestellt.

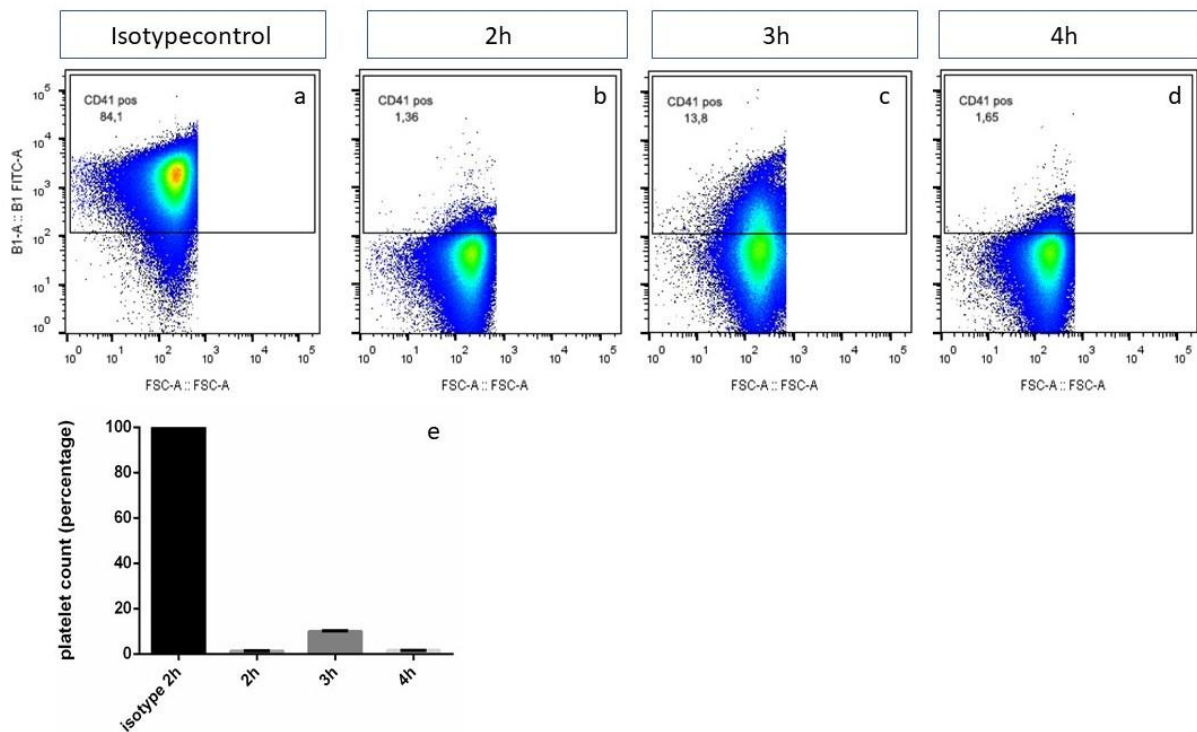


Abbildung 13: Nachweis Thrombozytendepletion im zeitlichen Verlauf. Zur Überprüfung der Dauer der depletierenden Wirkung des Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum wurde Vollblut 2, 3 und 4 Stunden nach *in vivo* Applikation entnommen und die Populationsgrößen der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie, gemessen. In dieser Abbildung sind exemplarisch die Dot Plots mit Färbung gegen CD41 jeweils eines Tieres 2 (b), 3 (c) und 4 (d) Stunden nach der Applikation des entsprechenden Antikörpers dargestellt. Zur Kontrolle wurde ein Kontrollserum zugeführt und die Thrombozytenpopulation gemessen (a). Diese Population wurde als Referenz für die Depletionsgruppen verwendet (e). Die Applikation von Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum führt zu einer effektiven Depletion von etwa >90% der Thrombozyten über mindestens 4 Stunden.

6.1.2 Positivkontrolle Aktivierungsparameter Thrombozyten: Aktivierung mittels Thrombin

Es zeigte sich bei der Stimulation von Plättchenreichem Plasma (PRP), dass ein signifikanter Anstieg der Expression von P-Selektin zu beobachten war. Dies wird aus der Abbildung 14 sichtbar. In der Expression von CD63 konnte kein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Aufgrund der begrenzten Versuchstiere war eine Wiederholung der Positivkontrolle nicht möglich. Der signifikante Anstieg des Aktivierungsparameters P-Selektin zeigt, dass die Färbemethode geeignet ist Änderungen valide zu erfassen.

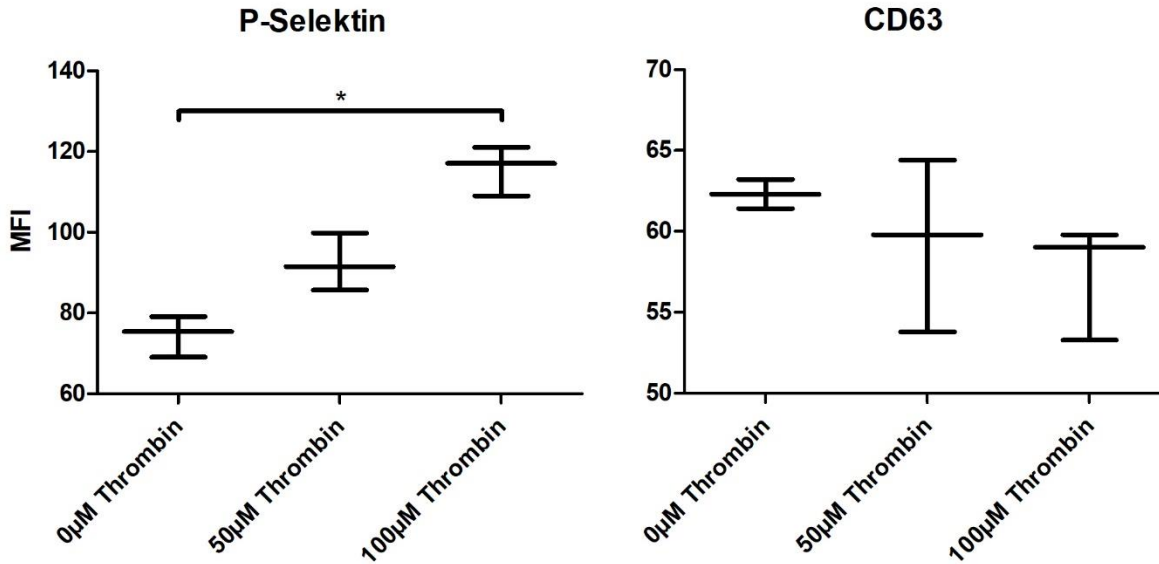


Abbildung 14: Nachweis Aktivierungsparameter Thrombozyten. Es wurde Plättchenreiches Plasma aus dem Blut von 6-8 Wochen alten C57BL/6N gewonnen. Dieses wurde mit Thrombin in Konzentrationen von 0-100µM für 4 min stimuliert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression von P-Selektin. Die Expression von CD63 stieg nicht signifikant an. Der signifikante Anstieg des Aktivierungsparameters P-Selektin zeigt, dass die Färbemethode geeignet ist Änderungen valide zu erfassen. Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3. * = $p < 0,05$.

6.1.3 Antikörper-Depletion CD4+ Tregs

Die Ergebnisse zeigen, dass ein leichter Rückgang der CD4+ Tregs an allen CD4+T-Zellen zu beobachten ist, außer in der Milz nach 2h. Graphisch lässt sich ein leichter Anstieg beobachten, den wir allerdings im Rahmen der Messungenauigkeit so interpretieren, dass am ehesten keine Anteilige Veränderung der CD4+ Tregs zu messen ist. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied in den gezeigten Gruppen zeigen. Allerdings lässt sich in allen anderen Gruppen (Lymphknoten nach 2h und 7d, sowie Milz nach 7d) ein Rückgang des CD4+ Treg-Anteils an allen CD4+T-Zellen erkennen. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 15 dargestellt.

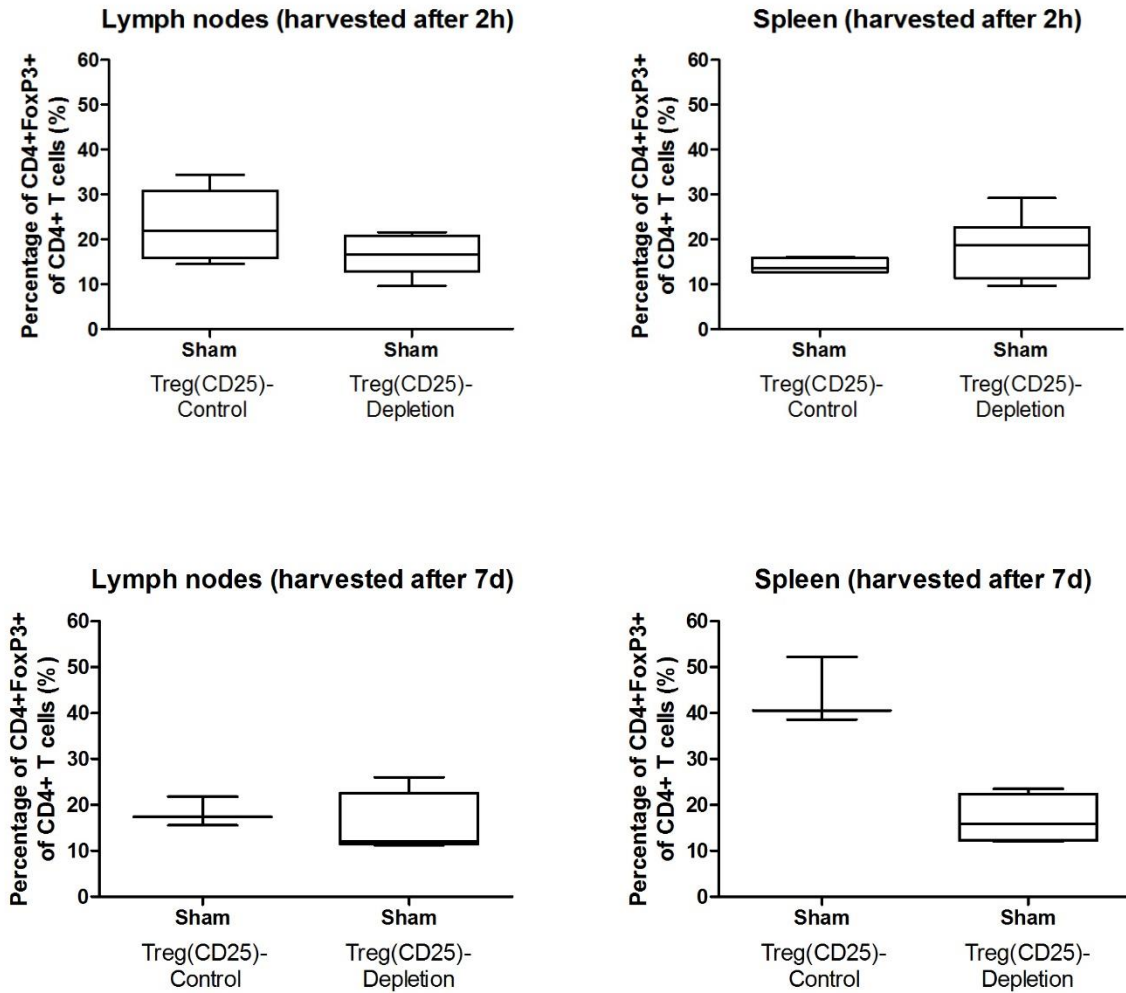


Abbildung 15: Nachweis Depletion CD4+ Tregs. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD4+ Zellen identifiziert, von denen wiederum die FoxP3+ (CD4+ Tregs) und FoxP3- (CD4+ non-Tregs, T-Effektor Zellen) unterschieden wurden. Es wurde der Anteil der CD4+ Tregs an allen CD4+ Zellen berechnet und gegeneinander aufgetragen. Den Mäusen wurde entweder der Isotypkontrollantikörper HRPN (Treg(CD25)-Control) oder der CD25-depletierende Antikörper PC-61 (Treg(CD25)-Depletion) verabreicht. An beiden Gruppen wurde keine Intervention durchgeführt (sham). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es ist jedoch ein Rückgang des CD4+ Treg-Anteils an allen CD4+T-Zellen in den Lymphknoten nach 2h und 7d, sowie in der Milz nach 7d zu beobachten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die hier angewandte Depletion zu einer deutlichen Verringerung der zirkulierenden CD4+ Treg Population führt. Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3.

6.1.4 Positivkontrolle Aktivierungsparameter CD4+ Tregs: Aktivierung mittels CD3 ϵ

Die mit CD3 ϵ stimulierten CD4+ Tregs aus Lymphknoten und Milz zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg sowohl der intrazellulären, als auch der oberflächlichen Aktivierungsparameter. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 16 und 17 graphisch veranschaulicht.

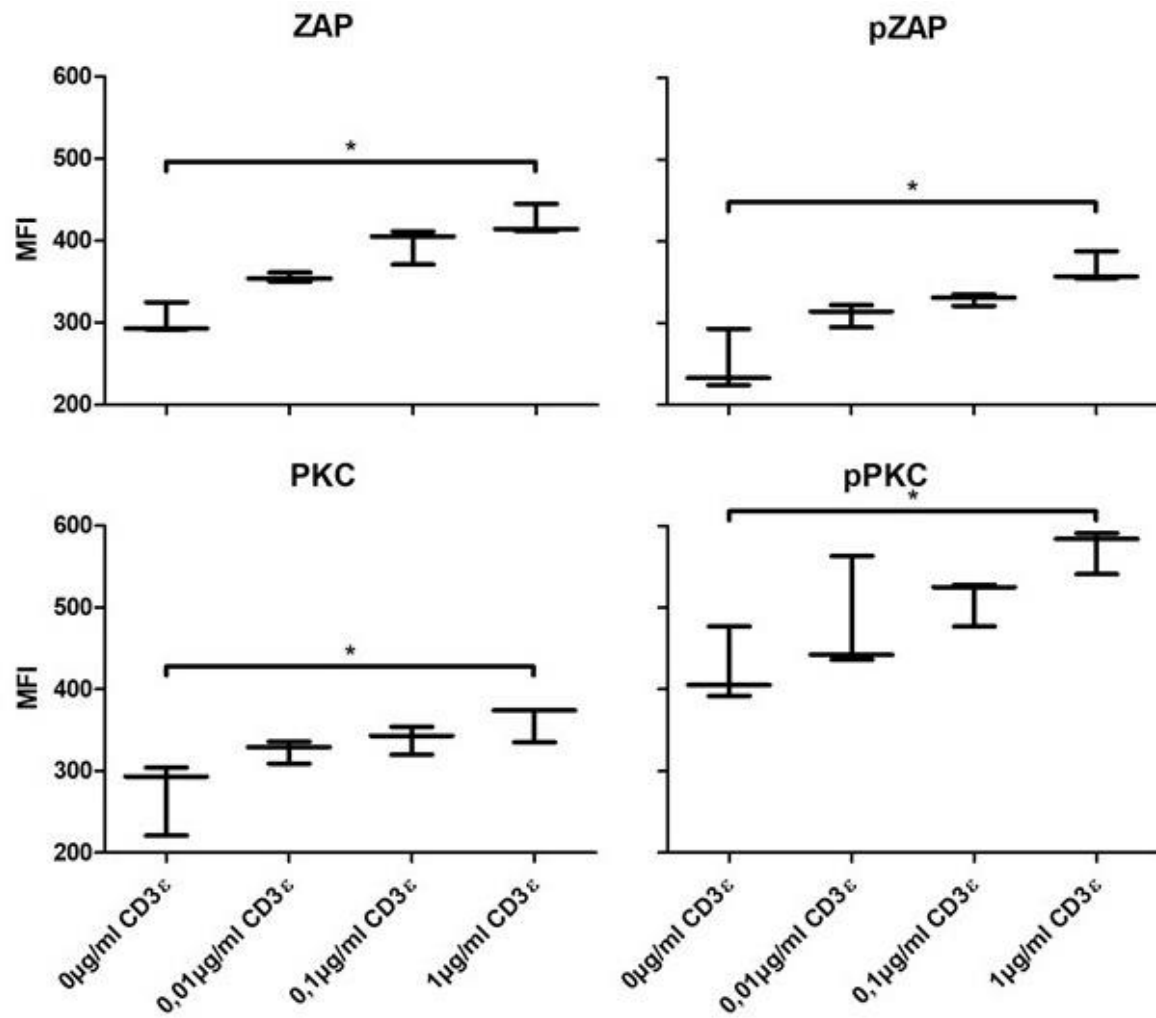


Abbildung 16: Nachweis der Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle in CD4+ Tregs nach Stimulation. Lymphknoten von 6-8 Wochen alten C57BL/6N Mäusen (n=3) wurden entnommen und die Zellen in C5 Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Suspension mit CD3ε, einem ein Teil des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex, in Konzentrationen von 0 bis 1 μg/ml für 60 min stimuliert. Es wurden dieselben Färbeprotokolle wie in den Hauptexperimenten verwendet. Der signifikante Anstieg der intrazellulären Signalmoleküle nach Stimulation zeigt, dass die Färbemethode geeignet ist Änderungen der CD4+ Treg Aktivierung valide zu erfassen. Angegeben sind die Werte als Median ±Q1 und Q3. *= p<0,05.

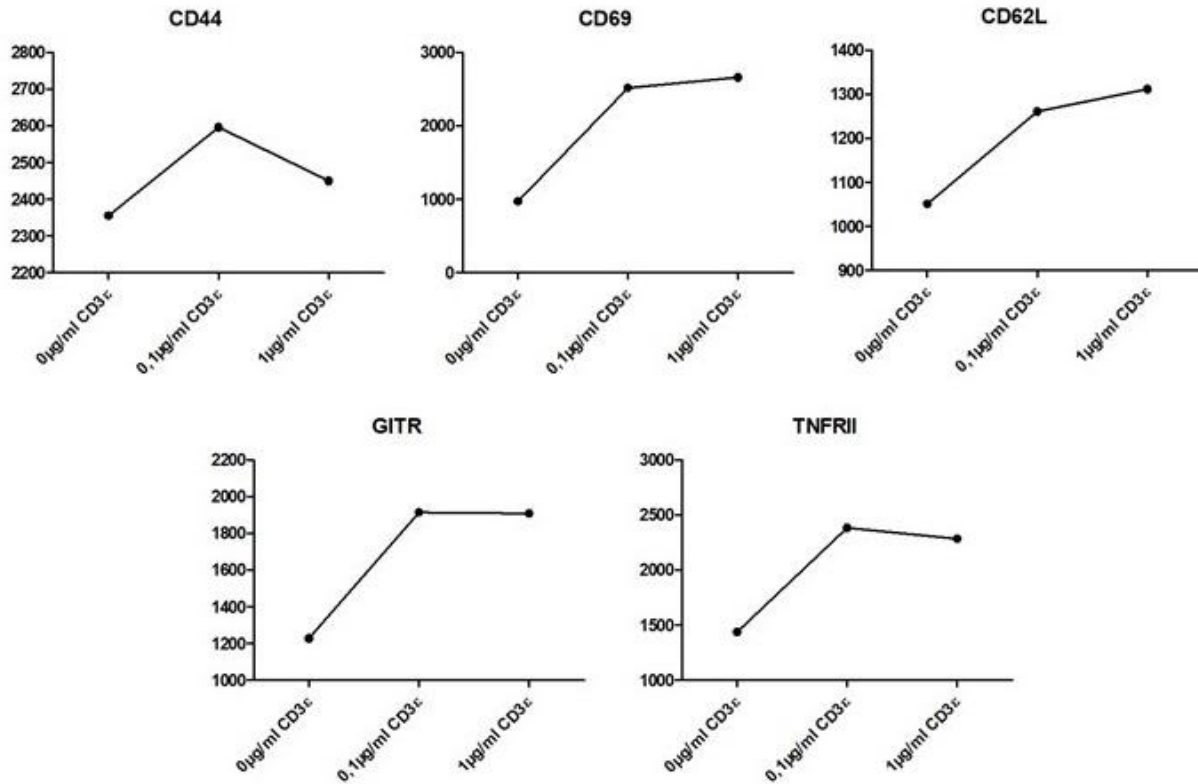


Abbildung 17: Nachweis der Aktivierung extrazellulärer Moleküle auf CD4+ Tregs nach Stimulation. Die Milz einer 6-8 Wochen alten C57BL/6N Maus wurde entnommen und die Zellen in C5 Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Suspension mit CD3ε, einem Teil des T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex, in Konzentrationen von 0 bis 1 µg/ml für 3 Tage stimuliert. Es wurden dieselben Färbeprotokolle wie in den Hauptexperimenten verwendet. Aufgrund des exemplarischen Charakters zum Nachweis der Methode konnte bei der zu geringen Versuchstierzahl keine Statistik erstellt werden. Der Anstieg der extrazellulären Moleküle nach Stimulation zeigt, dass die Färbemethode geeignet ist Änderungen der Zellaktivität valide zu erfassen.

6.2 A: Trauma führt zu einer Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ non-Tregs, in der frühen Phase nach Trauma

Wie in 5.10.3 beschrieben wurden CD4+ Tregs und CD4+ non-Tregs identifiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurden innerhalb der beiden Zellpopulationen die beiden TCR-assoziierten intrazellulären Signalmoleküle (Aktivierungsparameter) ZAP-70 und PKC-θ sowie deren phosphorylierte Form pZAP-70 und pPKC-θ mittels Phosphodurchflusszytometrie gemessen.

Um Unterschiede zwischen der posttraumatischen Aktivierung der CD4+ Tregs und CD4+ non-Tregs beobachten zu können, wurde die Expression der intrazellulären Signalmoleküle und deren Phosphorylierung gemessen. Herausfordernd ist dabei die Tatsache, dass CD4+ non-Tregs eine deutlich

größere Population darstellen als die der CD4+ Tregs. Damit einher geht, dass in der durchflusszytometrischen Messung eine statistisch signifikante Änderung nur schwer zu detektieren ist. In der frühen posttraumatischen Phase nach 2 Stunden zeigte sich eine gesteigerte Expression der intrazellulären Aktivierungsparameter bei den CD4+ Tregs, nicht jedoch bei den CD4+ non-Tregs (Abbildung 18 a-d). Dieser Effekt beschränkte sich auf die Lymphknoten (Abbildung 18 a-d) und ist in den Zellen der Milz nicht zu beobachten (Abbildung 18 e-h). Unterschiede zwischen der jeweils phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form beider Aktivierungsparameter konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 18 a-h). Es konnte eine grundsätzlich höhere Expression und Phosphorylierung der Signalmoleküle in CD4+ Tregs im Vergleich zu den CD4+ non-Tregs beobachtet werden. Dies wird deutlich betrachtet man isoliert die Sham Gruppen (Abbildung 18 a-h).

Die Induktion eines Verbrennungstraumas im Mausmodell führt zu einer frühen messbaren Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ Non-Tregs. Dieser Effekt ist nur in CD4+ Tregs gewonnen aus den drainierenden Lymphknoten nachvollziehbar, nicht jedoch in CD4+ Tregs gewonnen aus der Milz.

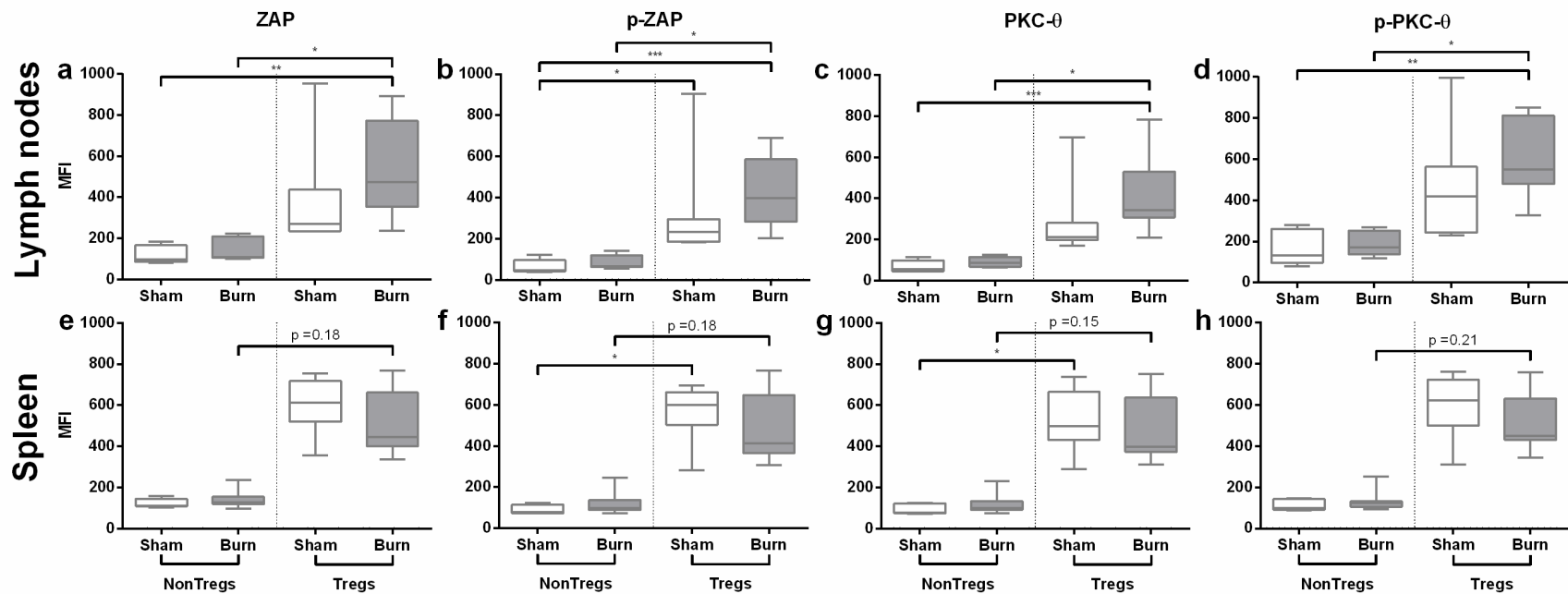


Abbildung 18: Trauma führt zu einer frühen Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ non-Tregs in der frühen Phase nach Trauma (2 Stunden). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der Signalmoleküle ZAP-70 und PKC-θ und deren phosphorylierte Formen pZAP-70 und pPKC-θ in CD4+ Tregs und CD4+ non-Tregs 2 Stunden nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) oder nach Scheinintervention (sham-Gruppen) gemessen (a-h). Den Tieren wurde 2 Stunden vor Trauma-induktion das nicht-depletierende Isotypkontrollserum appliziert. Es wurde eine gesteigerte Expression und Phosphorylierung der Signalmoleküle bei CD4+ Tregs, aber nicht bei CD4+ non-Tregs, gemessen. Dieser Effekt beschränkte sich auf die Lymphknoten (a-d) und konnte in der Milz nicht nachgewiesen werden. Die konstitutive Expression von (p)ZAP-70 und (p)PKC-θ ist in CD4+ Tregs höher als in CD4+ non-Tregs. In der frühen posttraumatischen Phase werden CD4+ Tregs in den drainierenden Lymphknoten schneller als CD4+ non-Tregs aktiviert. Angegeben sind die Werte als Median ±Q1 und Q3. *= p<0,05, **= p<0,01, ***= p<0,001. (Abbildung aus [153]) (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Immunologic Research, Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. Immunol Res., 64:508-517, 2016©)

6.3 B: Thrombozytendepletion führt zu einer verminderten Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen Phase nach Trauma

Wie in 5.10.3 beschrieben wurden CD4+ Tregs in der Zellsuspension aus Lymphknoten und in der Zellsuspension aus der Milz mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Sodann wurden die beiden TCR-assoziierten, intrazellulären Signalmoleküle (Aktivierungsparameter) ZAP-70 und PKC- θ , sowie deren phosphorylierte Formen pZAP-70 und pPKC- θ , durchflusszytometrisch gemessen.

Es zeigte sich in den CD4+ Tregs der nicht-depletierten Gruppen (Kontrollgruppen) ein Anstieg von (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ 2 Stunden nach Induktion des Verbrennungstraumas. Dieser Effekt konnte nur in Zellen der drainierenden Lymphknoten, nicht jedoch in der Milz, beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Bei der Depletion von Thrombozyten machten wir im Setting des Traumas folgende drei Beobachtungen. Erstens konnte die posttraumatische frühe Aktivierung von CD4+ Tregs nach Thrombozytendepletion nicht mehr beobachtet werden. Die Expression von (p)ZAP-70- und (p)PKC- θ war 2 Stunden nach Induktion des Verbrennungstraumas nach Thrombozytendepletion geringer als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zweitens beobachteten wir bei Thrombozytendepletion nicht nur ein Fehlen der Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma, sondern eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikante Reduktion der intrazellulären Expression und Phosphorylierung der Signalmoleküle in CD4+ Tregs. Diese Reduktion war, im Vergleich der burn-Gruppen der nicht-depletierten und thrombozytendepletierten Versuchsgruppen, signifikant. Dieser Effekt konnte sowohl in den Zellen der Lymphknoten als auch der Milz festgestellt werden. Drittens führte die Thrombozytendepletion nach Trauma-induktion zu einer geringeren Expression und Phosphorylierung der Aktivierungsparameter als in den sham-Gruppen der Kontrollgruppen. Dieser Effekt konnte bei (p)ZAP-70- und (p)PKC- θ beobachtet werden. Zwischen den phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Formen der Signalmoleküle konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

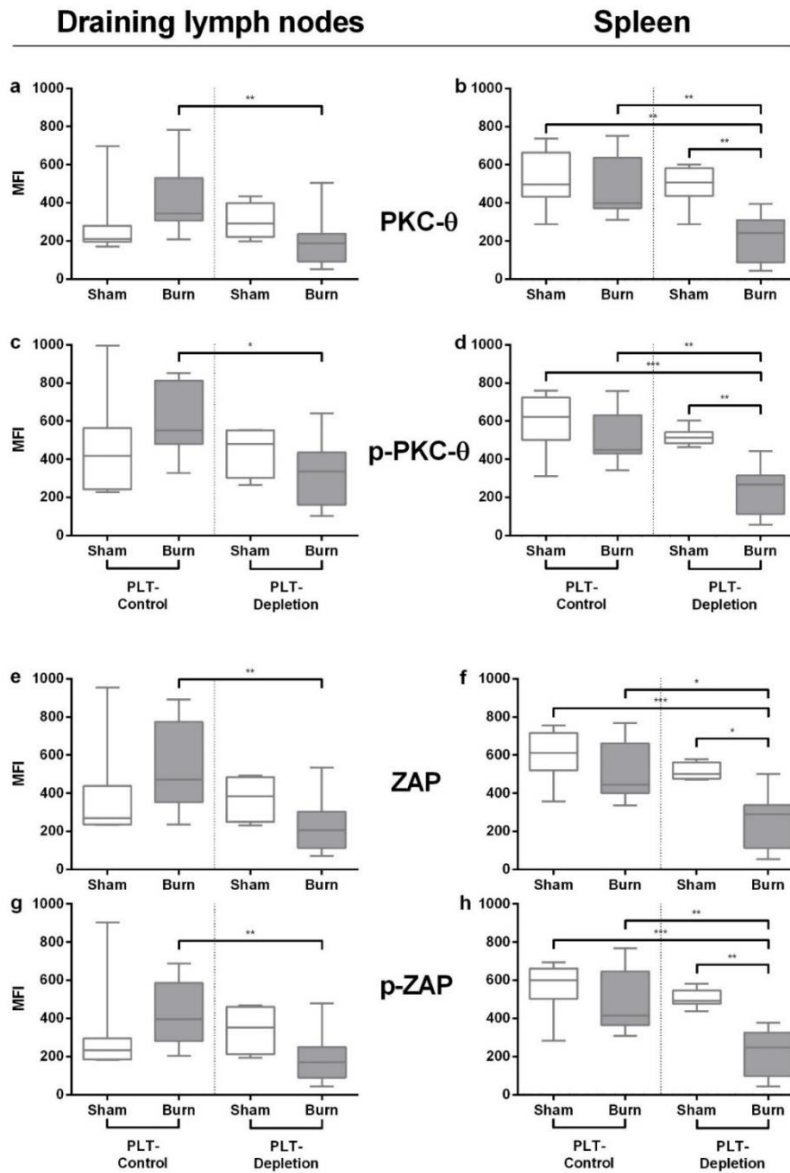


Abbildung 19: Thrombozytendepletion führt zu einer verminderten Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen Phase nach Trauma (2 Stunden). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der Signalmoleküle ZAP-70 und PKC- θ und deren phosphorylierten Formen pZAP-70 und pPKC- θ in CD4+ Tregs 2 Stunden nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) oder nach Scheinintervention (sham-Gruppen) gemessen (a-h). Den Mäusen wurde vorher entweder ein thrombozytendepletierendes Serum oder ein Kontrollserum appliziert. Es konnte bei den thrombozytendepletierten Gruppen nach Trauma-induktion eine verminderte Expression von (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ bei CD4+ Tregs im Vergleich zu den Trauma-Kontrollgruppen in Lymphknoten und Milz gemessen werden (a-h). Die Thrombozytendepletion führt zu einer verringerten Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen posttraumatischen Phase. Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. (Abbildung aus [153]) (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Immunologic Research, Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. Immunol Res., 64:508-517, 2016©)

6.4 C: Thrombozytendepletion führt zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in der späten Phase nach Trauma

Wie in 5.10.3 beschrieben wurden CD4+ Tregs mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Um die Aktivität in der späten posttraumatischen Phase zu quantifizieren wurden die Aktivierungsparameter CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-R II gemessen.

In den Gruppen nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) konnte 7 Tage nach Trauma kein Anstieg der Aktivierungsparameter im Vergleich zu den Scheininterventionsgruppen (sham-Gruppen) in Lymphknoten und Milz beobachtet werden. Dies galt sowohl für die thrombozytendepletierten-, wie auch die nicht-depletierten Versuchsgruppen, für alle Aktivierungsparameter gleichermaßen. Die Thrombozytendepletion führte zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in der späten Phase nach Trauma (7d). Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

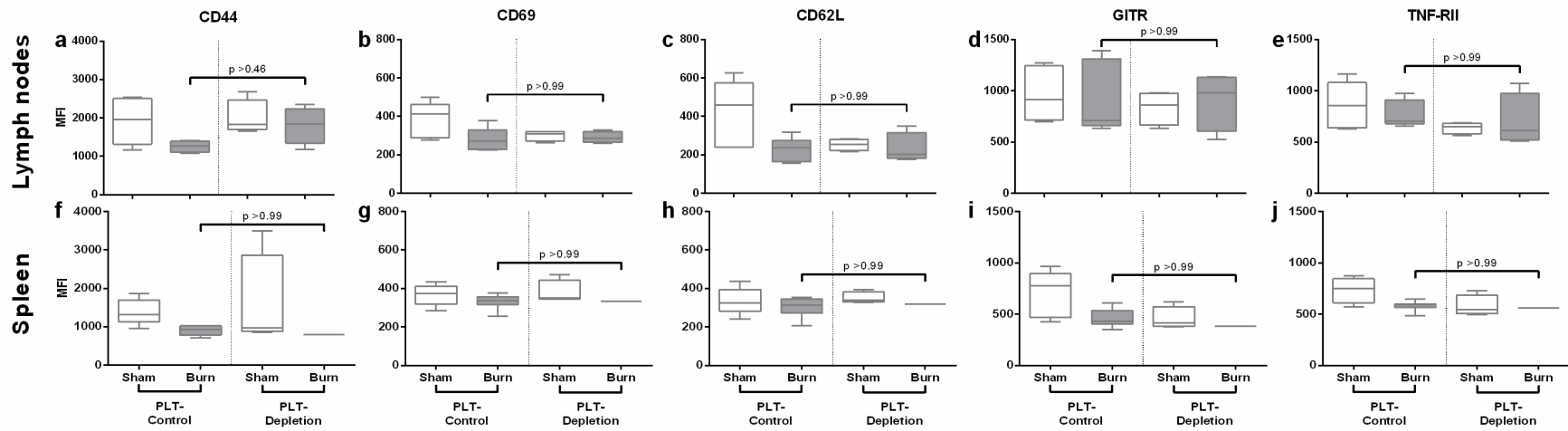


Abbildung 20: Thrombozytendepletion führt zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in der späten Phase nach Trauma (7 Tage). Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der Aktivierungsparameter CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-R II auf CD4+ Tregs 7 Tage nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) oder nach Scheinintervention (sham-Gruppen) gemessen (a-j). Den Mäusen wurde vor Induktion des Traumas oder der Scheinintervention entweder ein thrombozytendepletierender Antikörper oder ein Kontrollantikörper appliziert. Es konnten keine Unterschiede in der Expression der Aktivierungsparameter nach Trauma gemessen werden (a-j). Dies galt für alle Aktivierungsparameter in Lymphknoten und Milz. Die Thrombozytendepletion führt zu keiner veränderten Aktivität von CD4+ Tregs in der späten posttraumatischen Phase (7d). Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3. (Abbildung aus [153]) (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Immunologic Research, Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. *Immunol Res.*, 64:508-517, 2016©)

6.5 D: CD4+ Tregs beeinflussen nicht die Expression von Aktivierungsparametern der Thrombozyten

Im Gegensatz zu den vorhergegangenen Ergebnissen wurde im folgenden Set an Experimenten nach der posttraumatischen Aktivierung der Thrombozyten in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit von CD4+ Tregs gefragt. Mit diesem experimentellen Ansatz wurde der Frage nachgegangen, ob der Effekt von Thrombozyten auf CD4+ Tregs auch reziprok stattfindet. Die CD4+ Tregs wurden dazu in bestimmten Gruppen depletiert. Thrombozyten wurden wie in 5.10.6 beschrieben durchflusszytometrisch identifiziert. Die Marker CD62P (P-Selektin), CD63 und CD289 (TLR-9) wurden als Aktivierungsparameter für α -, elektronendichte und T-Granula gewählt.

Analog zu den Ergebnissen in 7.3 und 7.4 wurde untersucht, ob sich die Aktivität, in dem Fall der Thrombozyten, zwischen den Gruppen nach Verbrennung (burn-Gruppen) der CD4+ Treg-depletierten Gruppen und der nicht-depletierten Kontrollgruppen unterscheidet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in der Expression der Aktivierungsparameter in der frühen posttraumatischen Phase festgestellt werden. Ebenso wenig konnten Unterschiede in der späten posttraumatischen Phase festgestellt werden. Die etwas niedrigere aber statistisch signifikante Expression von CD63 in der späten posttraumatischen Phase wurde durch einen hohen Ausreißer in der burn-Gruppe der nicht-depletierten Kontrollgruppe interpretiert. Dies geschah, da kein anderes Ergebnis auf eine Änderung der Aktivität hingewiesen hätte. Die CD4+ Tregs beeinflussen nicht die Aktivierung von Thrombozyten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

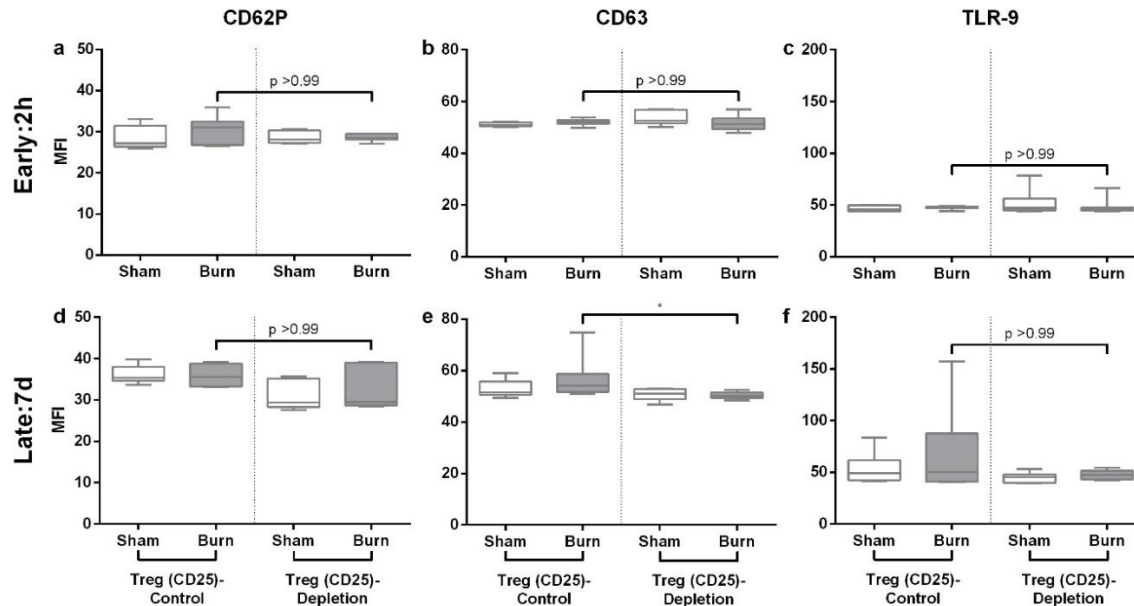


Abbildung 21: CD4⁺ Tregs beeinflussen nicht die Expression der Aktivierungsparameter von Thrombozyten nach Trauma. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression der Aktivierungsparameter CD62P (P-Selektin), CD63 und CD289 (TLR-9), repräsentativ für die α -, elektronendichten und T-Granula auf Thrombozyten 2 Stunden und 7 Tage nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) oder nach Scheinintervention (sham-Gruppen) gemessen (a-f). Den Versuchstieren wurde vorher entweder ein CD4⁺ Treg-depletierender Antikörper oder ein Kontrollantikörper appliziert. Es konnten keine Unterschiede in der Expression der thrombozytären Aktivierungsparameter nach Trauma gemessen werden. Dies galt für alle Aktivierungsparameter sowohl in der frühen (a-c) als auch der späten (d-f) posttraumatischen Phase. Die CD4⁺ Tregs beeinflussen nicht die Aktivierung von Thrombozyten. Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3. * = $p < 0,05$. (Abbildung aus [153]) (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Immunologic Research, Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4⁺ T regulatory cells in a mouse model. *Immunol Res.*, 64:508-517, 2016©)

6.6 E: CD4⁺ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase in der frühen Phase nach Trauma

Nachdem sich zeigte, dass posttraumatisch keine Änderung der immunologischen Aktivierungsparameter der Thrombozyten in Abhängigkeit von CD4⁺ Tregs auftritt, stellte sich die Frage, ob eine Änderung des thrombozytären Verhaltens in der Hämostase zu beobachten sein könnte. Dazu wurden wie in 5.12.40 in einer Gruppe die CD4⁺ Tregs mittels anti-CD25-AKs depletiert, es wurde eine Scheinintervention sowie eine Induktion des Verbrennungstraumas durchgeführt. Zum Vergleich wurde in der Isotypkontrollantikörpergruppe ebenfalls eine Scheinintervention und eine Induktion des

Verbrennungstraumas durchgeführt. Es wurde schließlich zur Messung der posttraumatischen Hämostase die Gerinnselbildung mittels Thromboelastometrie durch ROTEM® delta gemessen. Exemplarisch sind hier die Werte für die Zeit bis zur Bildung eines festen Gerinnsels (Clot formation time= CFT), der Geschwindigkeit der Gerinnselbildung (α -Angle), der Gerinnselhaftigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A5-30) und der maximalen Gerinnselhaftigkeit (Maximum Clot Firmness= MCF) angegeben.

Früh nach Trauma (nach 2 Stunden) konnten keine signifikanten Änderungen der Gerinnselbildung in CFT, α -Angle und A5-30/MCF innerhalb der Isotypkontrollgruppe und der CD4+ Treg-Depletionsgruppe, zwischen Sham- und Burn-Gruppen, festgestellt werden. Eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante, Änderung konnte allerdings in der Gerinnselhaftigkeit (A5-30/MCF) beobachtet werden. Die Burn-Gruppe nach CD4+ Treg-Depletion wies eine tendenziell etwas geringere Gerinnselhaftigkeit auf als die Sham-Gruppe. Ferner konnte bezüglich des α -Angle zwischen Burn- und Sham-Gruppe innerhalb der Isotypkontrolle und der CD4+ Treg-Depletion folgendes festgestellt werden. Innerhalb der Isotypkontrollgruppe trat nach Trauma-induktion keine Änderung auf, wohingegen nach CD4+ Treg-Depletion ein tendenziell kleinerer α -Angle zu beobachten war. Dieses entsprach den Ergebnissen in A5-30/MCF. Daraus konnte auf eine potentielle Beeinflussung der Hämostase durch CD4+ Tregs in der frühen posttraumatischen Phase geschlossen werden. In der späten Phase nach Trauma (7 Tage) konnten innerhalb der Isotypkontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Burn- und Sham-Gruppe festgestellt werden. Die Änderungen in den Messergebnissen CFT, α -Angle und A5-30/MCF wiesen auf eine schnellere und festere Gerinnselbildung nach Trauma hin, hinweisend auf eine posttraumatische Hyperkoagulabilität. Diese Tendenz war bei den Isotypkontrollgruppen und den CD4+ Treg-Depletionsgruppen gleichermaßen zu erkennen. Es gab also keinen Hinweis auf eine potentielle Beeinflussung der Hämostase in der späten posttraumatischen Phase durch CD4+ Tregs.

Im Vergleich aller Werte (CFT, α -Angle und A5-30/MCF) zwischen den 2-Stunden-Versuchsgruppen und den 7-Tages-Versuchsgruppen lässt sich ein Trend erkennen. Sowohl in der Isotypkontrollgruppe als auch der CD4+ Treg-Depletionsgruppe ist nach Induktion des Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) eine Hyperkoagulation nachweisbar. Die Zeit bis zur Bildung eines festen Gerinnsels (CFT) ist tendenziell geringer (Gerinnsel bilden sich schneller), die Geschwindigkeit der Gerinnselbildung (α -Angle) ist tendenziell höher (ebenfalls ein Hinweis auf schnellere Gerinnselbildung) und die Gerinnselhaftigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A5-30) sowie die maximale Gerinnselhaftigkeit (MCF) ist höher. Nach Verbrennung beobachten wir spät nach Trauma eine Hyperkoagulabilität. CD4+ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase früh nach Trauma. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

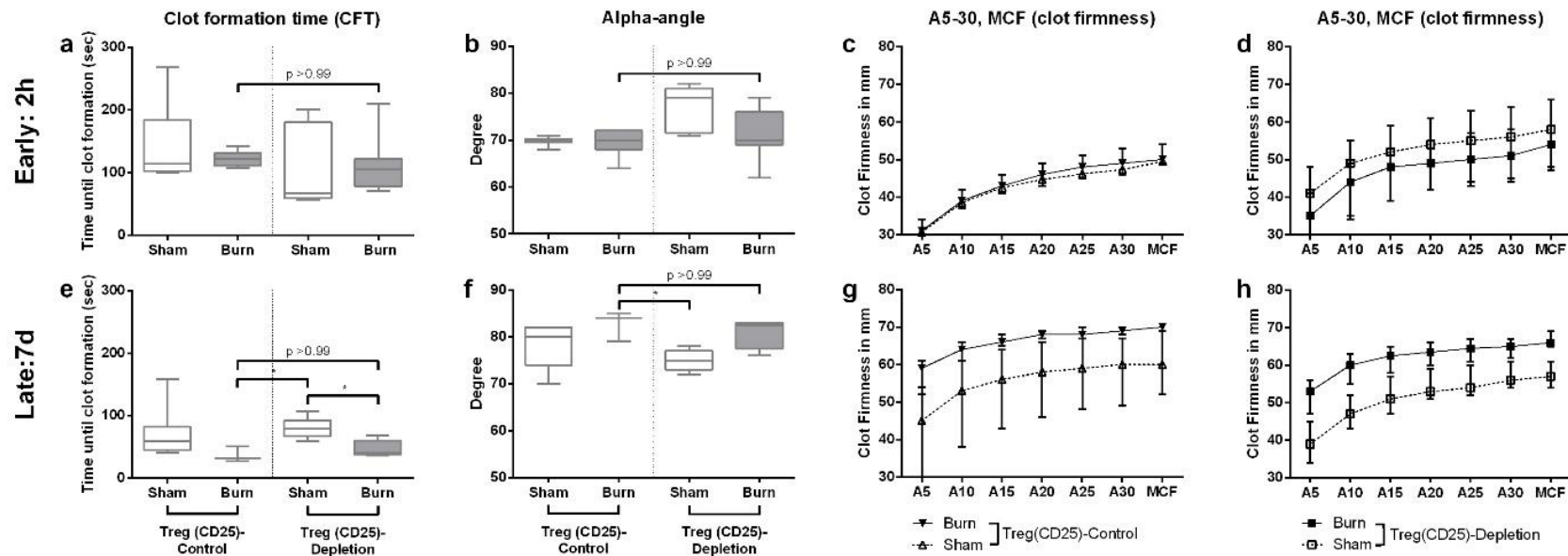


Abbildung 22: CD4+ Tregs beeinflussen die hämostatische Funktion der Thrombozyten in der frühen posttraumatischen Phase (2 Stunden). Mittels Thromboelastometrie (ROTEM® delta) wurde die posttraumatische Hämostase 2 Stunden und 7 Tage nach Induktion eines Verbrennungstraumas (burn-Gruppen) oder nach Scheinintervention (sham-Gruppen) gemessen. Den Mäusen wurde vorher entweder ein CD4+ Treg-depletierender Antikörper (anti-CD25-Antikörper) oder ein Kontrollantikörper appliziert. In CFT (a,e), α -Angle (b,f) und A5-30/MCF (c,d,g,h) konnten keine signifikanten Änderungen nach Trauma festgestellt werden. Ausnahme ist die CD4+ Treg-Depletionsgruppe nach 7 Tagen (e-h). Tendenziell wurde die frühe posttraumatische Hämostase bei α -Angle (b) und A5-30/MCF (c,d) durch CD4+ Treg-Depletion in Richtung Hypokoagulabilität beeinflusst. In der späten posttraumatischen Phase war keine Änderung feststellbar (e-h). CFT, α -Angle und A5-30/MCF wiesen in der späten posttraumatischen Phase höhere Werte auf als in der frühen, was im Sinne einer späten posttraumatischen Hyperkoagulabilität erklärt wurde. Nach Verbrennung tritt in der späten Phase nach Trauma eine Hyperkoagulabilität auf. CD4+ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase in der frühen Phase nach Trauma. Angegeben sind die Werte als Median \pm Q1 und Q3. * = $p < 0,05$ und Median \pm SEM (Abb.5e-h). (Abbildung aus [153]) (Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Immunologic Research, Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model. Immunol Res., 64:508-517, 2016©)

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Methodik

7.1.1 Tiere

Die posttraumatische Immunreaktion ist ein sehr komplexer Prozess. Es interagieren verschiedenste Immunzellen und Thrombozyten direkt oder mittels Messenger-Proteinen untereinander oder via dem Endothel [154, 155]. Zerstörte körpereigene Zellen setzen verschiedenste Signalmoleküle frei [11]. *In vitro* Verfahren können nur begrenzt die Interaktionen zwischen allen Spielern innerhalb der posttraumatischen Immunreaktion wiedergeben [156]. Beispielsweise könnte zwar in einer Zellkultur eine direkte Interaktion zwischen CD4+ Tregs und Thrombozyten beobachtet werden [157], allerdings ohne die Möglichkeit die komplexen Interaktionen mit anderen Zellen zu berücksichtigen. Das *in vitro* Experiment bildet nicht die biologische Relevanz im posttraumatischen Setting ab. Wir wählten für die Durchführung der Experimente ein murines *in vivo* Modell, durch etablierte Anästhesie- und Schmerzprotokolle wurde die Belastung für die Tiere auf ein Minimum reduziert.

Mäuse gelten als die am besten verstandenen Tiermodelle in der medizinischen Forschung und bieten sich daher für die Bearbeitung von grundlegenden Fragestellungen an [158]. C57BL/6N Mäuse sind die meistverbreiteten Versuchstiere, werden in vielen immunologischen Experimenten verwendet und gelten als etabliertes Modell in der Erforschung des Immunsystems [156]. Darüber hinaus werden bei diesem Maustyp häufig ähnliche Fragestellungen adressiert (z.B. SIRS, Sepsis, CD4+ Treg-Regulation), so dass sich mittlerweile sogar mathematische Modellberechnungen am Maustyp der C57BL/6 orientieren [159]. Darüber hinaus wird an diesen Mäusen auch das hier beschriebene Verbrennungsmodell angewandt [160]. Dadurch sind Vergleiche dieser Ergebnisse mit denen anderer Studien gut möglich.

7.1.2 Depletionsmodell

Wichtig in der Wahl der Methoden ist die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Für die Depletion der Thrombozyten wurde daher ein etabliertes Depletionsserum gewählt, das bereits in anderen Studien verwendet wurde [161-163]. Der Hersteller macht keine Angaben zum genauen Angriffspunkt des enthaltenen Depletionsantikörpers, jedoch kann anhand der bisher gewonnenen Ergebnisse in der Literatur davon ausgegangen werden, dass kein wesentlicher Bias zu befürchten ist. Von Vorteil ist, dass die Thrombozyten nahezu vollständig depletiert werden (>90%) (6.1.1) und somit davon ausgegangen werden kann, dass Überreste aufgrund ihrer Quantität keine wesentliche biologische Rolle

mehr spielen. Die Sterblichkeit der Mäuse nach der Depletion von Thrombozyten war in unseren Experimenten weder nach Induktion des Traumas, noch nach der Scheinintervention signifikant erhöht.

In der Positivkontrolle der Thrombozyten-Depletion (6.1.1) konnte eine suffiziente Depletion über mindestens 4 Stunden nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass bei den Versuchsgruppen in beiden Beobachtungszeiträumen von einer effektiven Depletion während den Interventionen ausgegangen werden kann. Zusätzlich kann bei den Versuchen mit einem Beobachtungszeitraum von 2 Stunden von einer relevanten Depletion bis zur Euthanasie ausgegangen werden (6.1.1). Wir verabreichten das Depletionsserum nur zu Beginn des Experimentes. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Thrombozytenpopulation innerhalb von 7 Tagen wieder erholt hat. Langer und Choi berichteten in ihrer Arbeit, dass die Depletion der Thrombozyten mit dem verwendeten Kaninchen anti-Maus Thrombozytendepletions-Serum für mindestens 3 Tage anhielt [163]. Sie verwendeten denselben Antikörper wie in diesem Experiment. Damit bestünde die Möglichkeit, dass anfängliche Änderungen der CD4+ Treg Aktivierung durch nachträgliche Zell-Zell-Interaktionen der CD4+ Tregs mit neu gebildeten Thrombozyten maskiert werden.

Die Depletion der CD4+ Tregs erfolgte ebenfalls mit einem breit etablierten Antikörper (PC-61). Auch hier ist die Vergleichbarkeit aufgrund der weitläufigen Anwendung gegeben [164, 165]. In der Literatur gibt es bis heute Diskussionen über die exakte Einteilung von CD4+ Tregs und deren Subtypen anhand der verschiedenen Marker. Weitestgehend einig ist man sich jedoch, dass im humanen sowie dem murinen Setting CD25 und FoxP3 als geeignete Marker zur CD4 Treg Identifizierung gelten [40]. Wie bereits von Sakaguchi und Mitarbeitern im Jahre 2003 beschrieben [36], so besteht auch heute Einigkeit, dass FoxP3 eine wesentliche Rolle für die Funktion der CD4+ Tregs spielt [166]. Zur Identifikation von CD4+CD25+FoxP3+ Tregs ist es ausreichend, CD4 und FoxP3 als Identifikationsmarker zu verwenden, da die Expression von CD25+ zumeist abhängig von FoxP3 ist [40]. In dieser Studie wurde bewusst darauf verzichtet, zwischen nTregs und pTregs zu unterscheiden, da die generelle Funktion der CD4+ Tregs abgebildet werden sollte und genaue Marker zur Unterscheidung beider Typen bis heute nicht völlig eindeutig identifiziert sind [32, 41]. Es konnte gezeigt werden, dass mittels PC-61 CD4+ Tregs in Mäusen effektiv depletierbar sind [165]. CD25 ist allerdings nicht rein spezifisch für CD4+ Tregs. Es wird ebenfalls auf Prä-B-Zellen (nicht auf reifen B-Zellen), transient auf T-Effektor-Zellen, fraglich auf Endothelzellen und auf dendritischen Zellen bei Aktivierung exprimiert [34, 35]. Die Expression auf CD4+ Tregs ist jedoch wesentlich höher als auf den anderen Zellen, ausgenommen den dendritischen Zellen im aktivierten Zustand [35]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass von einer unerwünschten Depletion, wenn überhaupt, hauptsächlich dendritische Zellen betroffen sind. Hypothetisch kann der Antikörper neben

einer unerwünschten Depletion von dendritischen Zellen auch zu einer Antikörper-getriggerten Immunomodulation der Zellen führen, potentiell bis hin zu einer Beeinträchtigung ihrer immunologischen Funktion [34]. Die Depletion von CD4+ Tregs findet jedoch lange vor der Induktion des Traumas statt, so dass nicht von einer Aktivierung der dendritischen Zellen zum Zeitpunkt des Experimentes ausgegangen werden kann. Ob eine unerwünschte Depletion der dendritischen Zellen Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten hätte, ist nicht bekannt. Denkens wert wäre die Wiederholung der Experimente mit sogenannten DEREK Mäusen [167]. In diesen können selektiv CD4+ Tregs induktiv depletiert werden, wobei auch diese Methode Schwächen aufweist [167, 168]. Dies würde zur Verifizierung dieser Arbeit führen. Aufgrund der begrenzten Zahl bewilligter Versuchstiere entfiel dies jedoch.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Anwendung des depletierenden Antikörpers PC-61 in allen Gruppen (Lymphknoten nach 2h und 7d, sowie Milz nach 7d) der CD4+ Treg-Anteil an allen CD4+T-Zellen rückgängig ist. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse der Milzzellen nach 2h dar, diese wurden als Messungenauigkeit interpretiert. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die in der Literatur zu finden sind. So beschreiben beispielsweise auch Setiady und Mitarbeiter, dass die Depletion von CD4+ Tregs mittels PC-61 nicht vollständig ist, aber ein anteiliger Rückgang der CD4+ Tregs an allen CD4+ T-Zellen bewirkt wird [165]. Dabei bewegt sich der gemessene Anteil von CD4+ Tregs etwa im Bereich dessen, den auch andere Autoren beschreiben (Median 17,37% bis 22,05% bei Lymphknoten und 13,64% bis 43,82% in der Milz) [165, 169]. Die anteilige Reduktion der CD4+ Tregs fiel bei unseren Experimenten nicht so ausgeprägt aus, wie in den benannten Arbeiten, die Reduktion ist jedoch deutlich erkennbar. Zudem war es aus nicht möglich die Reduktion der CD4+ Tregs im peripheren Blut zu messen, da bis zur vollständigen Etablierung des Verfahrens nicht ausreichend Versuchstiere zur Verfügung standen. Es ist davon auszugehen, dass in diesem ebenfalls eine deutliche Reduktion der CD4+ Tregs zu beobachten ist. Die Dauer der Depletion konnte im eigenen Versuchsvorhaben nicht untersucht werden. Dies war aufgrund der limitierten Versuchstierzahl nicht möglich. In anderen Arbeiten wird jedoch beschrieben, dass die Depletion mittels PC-61 über mehrere Wochen anhält. So beschreiben Setiady und Mitarbeiter eine maximale Depletion nach 8 Tagen, die 2-3 Wochen anhält [165]. Couper und Mitarbeiter beschreiben eine Depletionsdauer von 2 Wochen [170]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die durchgeführte Depletion in den 7-Tages-Experimenten bis zum letzten Tag suffizient war.

Bei beiden Depletionsverfahren, sowohl der Thrombozyten wie auch der CD4+ Tregs, muss die Interpretation vorsichtig erfolgen. Wie oben beschrieben kann jedoch aufgrund der weiten Verbreitung beider Depletionsverfahren von einer hohen Reliabilität und Validität ausgegangen werden.

7.1.3 Narkose

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch. Dies wurde so gewählt, um die Tiere, anders als bei einer Narkose mit Inhalationsnarkotika, frei bewegen zu können und das Verbrennungstrauma in einem engen Zylinder durchführen zu können. Es ist bekannt, dass Ketamin immunsuppressive Effekte auf verschiedene Immunzellen hat, die möglicherweise die Ergebnisse beeinflussen können [171]. Dies ist bislang, in Bezug auf Thrombozyten und CD4+ Tregs, unzureichend erforscht. In Ratten konnte gezeigt werden, dass die frühe Applikation von Ketamin nach Verbrennung zu einer Reduktion der Mortalität führte. Diese war vermutlich durch die Reduktion von IL-6 vermittelt [172]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich allerdings nicht ablesen, ob eine Interaktion mit CD4+ Tregs sowie Thrombozyten vorhanden ist. Es gibt allerdings eine Empfehlung von Al-Mousawi und Mitarbeitern, die verschiedene Anästhesiemethoden in einem Verbrennungsmodell der Ratte untersucht haben. Sie kommen zu dem Schluss, dass bei länger anhaltender Anästhesie der Versuchstiere die Kombination aus Ketamin/Xylazin sowie Buprenorphin zu geringeren abrupten Änderungen in der Immunbalance führt als im Vergleich zur Inhalationsnarkose mit Isofluran [173].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund fehlender Studien eine Beeinflussung der Experimente durch die Anästhesie nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Es handelt sich hier jedoch um ein weit verbreitetes anästhesiologisches Verfahren, eine Vergleichbarkeit mit anderen Experimenten besteht. Außerdem wurden alle Gruppen die gleiche Narkose unterworfen.

7.1.4 Verbrennungsmodell

Das murine Verbrennungsmodell geht mit einer überschwelligeren und hoch reproduzierbaren systemischen Aktivierung des Immunsystems einher, dem SIRS [174]. Im Gegensatz zur Sepsis stellt das SIRS eine sterile Inflammation dar. In dieser Arbeit wurde ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen CD4+ Tregs und Thrombozyten erforscht. Eine bakterielle Infiltration wird in diesem Modell konsequent vermieden: es wurden keine inneren Organe verletzt und es erfolgte die regelmäßige Kontrolle der Wunde auf bakterielle Infektion. Es wurde das murine Verbrennungsmodell, zuerst beschrieben von Stieritz und Holder [175] und von Hamood [176] weiterentwickelt, angewendet. Dieses Verbrennungsmodell ist bis heute in der Literatur weit verbreitet [160] und lässt daher Vergleiche zu. Aufgrund der III°igen Verbrennung und der einhergehenden subdermalen Schädigung der Schmerzrezeptoren ist das Modell auch für Langzeitversuche geeignet [160].

7.1.5 Identifikation der CD4+ Tregs

Die Klassifikation der CD4+ Tregs ist in der Literatur nicht einheitlich. Es gibt jedoch die Übereinstimmung, dass zwei Identifikationsmerkmale in jedem Fall nötig sind. Das ist zum einen der CD4-Rezeptor, mit dem eine CD4+ T-Zelle als solche erkennbar ist und zum anderen der intrazellulär gelegene Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein-3 (FoxP3) [166]. Ebenfalls eine gewichtige Rolle spielt CD25, ein IL-2 Rezeptor [55], dessen Expression wie in 7.1.2 beschrieben von CD25+ ist jedoch weitestgehend abhängig von FoxP3 [40]. In dieser Arbeit ging es weniger um die genaue Differenzierung der Funktionen der einzelnen CD4+ Treg-Subtypen, wie zum Beispiel der tTregs und pTregs, sondern um einen generellen Nachweis der Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4+ Tregs. Mit dem angewendeten Färbeprotokoll wurde keine Identifikation der Subtypen durchgeführt, es wurde eine möglichst große Breite an CD4+ Tregs erfasst.

7.1.6 CD4+ Tregs: Wahl der Aktivierungsparameter

Zur Identifikation der CD4+ Tregs wurden der CD4-Rezeptor und der Transkriptionsfaktor FoxP3 gewählt. Je nach Beobachtungsdauer wurden unterschiedliche Aktivierungsparameter gewählt.

Für die Versuchsgruppen mit einer Beobachtungslänge von 2 Stunden wurden intrazelluläre Signalmoleküle (ZAP-70 und PKC- θ), sowie deren phosphorylierte Form gewählt (pZAP-70 und pPKC- θ). Bei Aktivierung reagiert die Zelle sehr schnell mithilfe dieser Moleküle und deren Phosphorylierung. Daher kann man anhand der quantitativen Auswertung Aussagen über die Aktivität der Zellen treffen. Beide Signalmoleküle sind mit der T-Zell-Rezeptor (TCR)-Aktivierung assoziiert. ZAP-70 gehört zur SYK-Familie, welche der ζ -Kette des TCR/CD3 Komplex interagiert. Die ist eines der ersten Downstream-Moleküle in der Signalkaskade des TCR/CD3 Komplex [136]. Protein Kinase C- θ (PKC- θ) ist ebenfalls Teil der NF- κ B-abhängigen TCR Signalkaskade [140]. Die Aktivierung von PKC- θ wird durch die Bindung von CD28-B7 verstärkt. PKC- θ wirkt überwiegend stimulatorisch in T-Effektor-Zellen, erfüllt aber in CD4+ Tregs überwiegend eine Rolle als Mediator einer negativen Feedback-Schleife bei TCR Aktivierung [177]. Neben der Messung des quantitativen Vorkommens der Moleküle wurde, im Rahmen der Phospho-Durchflusszytometrie, auch das Vorkommen der phosphorylierten Form gemessen. Beide Moleküle sind in ihrer phosphorylierten Form aktiv. In früheren Arbeiten konnten Hanschen und Mitarbeiter bereits nachweisen, dass sowohl ZAP-70, als auch PKC- θ nach Verbrennungstrauma in CD4+ Tregs aktiviert werden [138].

Für die Versuchsgruppen mit einer Beobachtungsdauer von 7 Tagen wurden Oberflächenproteine als Aktivierungsparameter gewählt: CD44, CD69, CD62L, GITR und TNF-R II. Diese Parameter wurden bereits

in unterschiedlichen Studien als Aktivierungsparameter für T-Zellen verwendet und gelten als etabliert [143-147].

CD44 ist ein Oberflächenrezeptor mit Homing-Funktionen für Leukozyten, vermittelt aber auch intrazelluläre Effekte [178]. In einer Studie aus dem Jahr 2006 untersuchten Firan und Mitarbeiter die Expression von aktiviertem CD44 auf CD4+CD25+Tregs und konnten zeigen, dass die suppressive Potenz der CD4+CD25+Tregs bei Expression von aktiviertem CD44 signifikant erhöht ist [143]. CD69 ist ein C-Typ Lektin-Rezeptor, der bei Aktivierung von ruhenden Lymphozyten verstärkt exprimiert wird. Ursprünglich ging man von einer stimulierenden Funktion aus. Demgegenüber stehen heutzutage immer mehr Arbeiten, die immunsuppressive Funktionen nach CD69 Stimulation beobachten. Einig ist man sich jedoch, dass CD69 durch die schnelle Exprimierung nach Zellaktivierung ein geeigneter Aktivierungsparameter ist [147]. Zudem wurde gezeigt, dass CD69 auf CD4+ Tregs nach T-Zell-Rezeptor-abhängiger und -unabhängiger Stimulation verstärkt exprimiert wird [179]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD69 für die Funktion von CD4+ Tregs wesentlich ist [147, 180]. CD62L ist ein Zelladhäsionsmolekül von der Gruppe der Selektine, das Leukozyten die Adhäsion an das Endothel und die darauffolgende Migration ermöglicht. Bei Aktivierung sind alle Leukozyten in der Lage große Mengen von zellmembran-gebundenem L-Selektin enzymatisch abzutrennen („shedding“) und die funktionellen Proteine in die Blutbahn zu entlassen. Anders als bei konventionellen CD4+ T-Effektor Zellen spalten CD4+ Tregs höhere Mengen an L-Selektin enzymatisch ab, wobei aber eine vergleichbare Expression auf der Zelloberfläche mit den CD4+ T-Effektor Zellen zu beobachten ist. Die Expression von L-Selektin ist für die normale Migration von CD4+ Tregs wesentlich [146]. Interessanterweise bietet die Expression von CD44 und CD62L eine Unterscheidungsmöglichkeit unterschiedlicher CD4+ Treg-Subtypen. Smigiel und Mitarbeiter unterteilen anhand dieser Rezeptoren zum einen CD44^{low}CD62L⁺ cTregs, die zwischen den lymphatischen Organen beziehungsweise Gewebe zirkulieren, und zum anderen CD44^{high}CD62L^{low}/- eTregs, die hauptsächlich im nicht-lymphatischen Gewebe ansässig sind [68]. Einige Arbeiten zeigen, dass CD62L+CD4+FoxP3+Tregs effektiver immunsuppressiv wirken als CD62L-CD4+FoxP3+Tregs, was auf eine hohe Relevanz von CD62L für CD4+ Tregs hinweist [181-183]. Eine Unterscheidung der Subtypen wurde in unserem Setting nicht durchgeführt, CD62L und CD44 wurden unabhängig voneinander erhoben und dienen dem Ziel, die Aktivität von CD4+ Tregs zu untersuchen. GITR ist ein Teil der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie und wird auch TNF-Superfamilien-Mitglied 18 (TNFRSF18) genannt [184]. Wie auch bei den anderen o.g. Aktivierungsparametern (CD62L ausgenommen) wird GITR bei der Aktivierung von CD4+T-Zellen verstärkt exprimiert [145], wobei sich darüber hinaus zeigt, dass dieser Effekt stärker in CD4+ Tregs zu beobachten ist als in CD4+ T-Effektor-Zellen [185]. Er gilt daher als etablierter Aktivierungsparameter.

Die Funktion von GITR auf CD4+ Tregs ist noch nicht vollständig geklärt. In ersten Studien konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung von CD4+ Tregs mittels GITR zu einer Hemmung ihrer immunsuppressiven Funktion führte. In anderen Experimenten konnte hingegen beobachtet werden, dass CD4+ Tregs in Anwesenheit von IL-2 vermehrt proliferieren und teilweise stimuliert werden. Vermutet wird, dass die GITR-Aktivierung nur in Anwesenheit von CD4+ T-Effektor-Zellen beurteilt werden kann. Die Wirkung scheint in vivo dosisabhängig und abhängig von der Aktivierung der CD4+ T-Effektor-Zellen zu einem unterschiedlichen Verhalten der CD4+ Tregs zu führen. Eine letztendliche Klärung der Funktion steht noch aus [145, 186]. TNF-RII ist ein auf Lymphozyten exprimierter Rezeptor, über den TNF- α seine Wirkung auf diese ausübt und einen stimulierenden Effekt hat. Seine Aktivierung bewirkt eine verstärkte Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche der CD4+ Tregs [187]. Die Aktivierung des Rezeptors wirkt co-stimulatorisch und verstärkt die Aktivierung durch den T-Zell-Rezeptoren. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung relevant für deren immunsuppressive Funktion ist. So wurde in Experimenten deutlich, dass TNF-RII für die immunsuppressive Funktion der CD4+ Tregs eine größere Rolle spielt als CD25. Zusammenfassend besteht Konsens, dass die Aktivierung von TNF-RII auf CD4+ Tregs ein verbessertes Überleben der Zellen, eine hoch-Regulierung von FoxP3, eine Verstärkung der Immunsuppression und eine Proliferation zur Folge hat [144].

Aufgrund der hier beschriebenen zahlreichen Anwendungen und der teilweise herausgehobenen funktionellen Relevanz für CD4+ Tregs ergibt die Kombination der Messung der gewählten Aktivierungsparameter ein valides Bild der Aktivierung oder nicht-Aktivierung der CD4+ Tregs.

7.1.7 Wahl der Beobachtungszeiträume

Gunst und Mitarbeiter haben in einer Studie im Jahr 2010 untersucht, innerhalb welcher Zeiträume Patienten nach Trauma versterben [188]. Ursprünglich ist man in der Literatur von einer drei-gipfeligen Sterbekurve ausgegangen, mit einer Einteilung in sofortiger Mortalität, frühe und späte Mortalität [189]. Die zeitliche Einteilung ist dabei nicht in allen Studien dieselbe. Die meisten Autoren beschreiben mit der sofortigen Mortalität die Sterblichkeit am Ort des traumatischen Geschehens (oder auch bis zu einer Stunde nach Eintreffen in der Notaufnahme), mit der frühen Mortalität die Sterblichkeit innerhalb der ersten Stunden (<4h oder <24h) und mit der späten Mortalität die Sterblichkeit nach Wochen (1-6w) [5]. Eine aktuelle Studie beschreibt eine initial hohe Mortalität mit stetigem Abfall ohne drei-gipfelige Sterbekurve [190]. Die sofortige Mortalität entsteht überwiegend durch sofortiges Versterben oder schwere nicht überlebbare Verletzungen, häufig durch Schädel-Hirn-Traumata und/oder Schäden am kardiovaskulären System [5]. Die sofortige und frühe Mortalität nach Trauma, welche nicht-überlebbare Traumafolgen reflektiert, ist nicht Gegenstand dieser Studie. Gegenstand dieser immunologischen

Untersuchungen ist die potentiell reversible späte Mortalität nach Trauma, hervorgerufen durch Dysbalancen des Immunsystems mit Entwicklung eines SIRS, Organversagen oder Sepsis.

Klinisch werden die Entwicklung eines posttraumatischen SIRS, eines Organversagen oder einer Sepsis 3-5 Tage nach Trauma beobachtet. In vorausgehenden Arbeiten wurde von Hanschen und Mitarbeitern die Kinetik und Lokalisation der Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma aufgezeigt [138], CD4+ Tregs werden bereits 15 Minuten nach Trauma aktiviert, diese Aktivierung ist zunächst lokal im Bereich der drainierenden Lymphknoten zu beobachten. Die Aktivität von CD4+ Tregs weist nach 1-2 Stunden einen Gipfel auf, daher haben wir für diese Studien den Beobachtungszeitpunkt nach 2 Stunden festgelegt.

Bezüglich der Wahl des späten posttraumatischen Untersuchungszeitraums orientierten wir uns an den Arbeiten von Gunst und Sobrino, die in der späten posttraumatischen Phase einen leichten Anstieg der Mortalität feststellten. In diesen Arbeiten werden mehrere Todesursachen nach etwa 1-2 Wochen benannt, die auf immunologische Dysfunktionen zurückzuführen sind, darunter Sepsis, Multiorganversagen, oder Infektionen [5, 188]. In einer aktuelleren Studie von Lansink und Mitarbeitern beschreiben die Autoren ebenfalls das Multiorganversagen als dritthäufigste Todesursache bei den späten Todesursachen nach Trauma [190].

Es wäre interessant gewesen, insbesondere in den ersten posttraumatischen Stunden, einen zeitlichen Verlauf der CD4+ Treg-Aktivierung beziehungsweise der Thrombozytenaktivierung aufzuzeichnen. Dafür hätte es allerdings mehr der Versuchstiere bedurft. Aufgrund der Unklarheit, ob überhaupt eine Interaktion vorliegt, erscheint eine Versuchsreihe mit Darstellung der Kinetik zum jetzigen Zeitpunkt verfrüht und tierschutzrechtlich nicht vertretbar.

7.1.8 Thrombozyten: Wahl der Aktivierungsparameter

Zur Identifikation der Thrombozyten wurde der Rezeptor CD41 gewählt. Der Rezeptor ist ein Teil des Integrinkomplex GPIIb/IIIa (oder auch α IIb β 3), der aus CD41 (GPIIb) und CD 61 (GPIIIa) zusammengesetzt ist [191]. Dieser Integrinkomplex bindet hauptsächlich Fibrinogen und ist wesentlich für die hämostatische Funktion von Thrombozyten. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor wird von Megakaryozyten und Thrombozyten im Blutkreislauf exprimiert und gilt daher als Identifikationsprotein für Thrombozyten.

Anders als bei CD4+ Tregs gibt es bei Thrombozyten keine etablierten Parameter, die eine klare immunologische Aktivierung anzeigen. Dies ist dadurch bedingt, dass die immunologische Rolle der Thrombozyten noch nicht vollständig geklärt ist und noch diskutiert wird. Wir wählten einen etablierten Marker der Hämostase CD62P (P-Selektin) [95]. Um einen Hinweis auf eine potentielle immunologische

Aktivierung zu bekommen, wählten wir zusätzlich den Marker TLR-9 (CD289). Letzterer wurde vor nicht allzu langer Zeit auf Thrombozyten entdeckt [94]. Normalerweise wird TLR-9 intrazellulär exprimiert; konnte jedoch auch in Ruhe auf der Zelloberfläche von Thrombozyten nachgewiesen werden. Nach Thrombozytenaktivierung wird er verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert [94]. TLR-9 ist in der Lage virale und bakterielle DNA Motive (CpG Motive), sowie Metabolite, die besonders unter oxidativen Stress vorkommen (Carboxy-Alkyl-Pyrrol), zu binden. Aufgrund letzterem wird vermutet, dass TLR-9 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Thrombozyten unter endogenem Stress (sterile Entzündung) spielt, im Gegensatz zu exogenem Stress, wie Beispielsweise der Sepsis [82].

In Anlehnung an die Hypothesen von Herter und Mitarbeitern, dass die Granulafreisetzung der Thrombozyten stimulationsabhängig ist [95], untersuchten wir Oberflächenmarker, deren Expression überwiegend an eine bestimmte Granula gebunden ist. Mirlashari und Mitarbeiter haben die Freisetzung von Granula mit der damit verbundenen unterschiedlichen Expression von P-Selektin und CD63 verglichen und sind zu dem Schluss gekommen, dass P-Selektin (CD62P) überwiegend aus α -Granula freigesetzt werden [148] und CD63 überwiegend aus den elektronendichten Granula [148, 192]. Es gibt allerdings hinsichtlich der Expression von CD63 und P-Selektin (CD62P) Überschneidungen [148, 192]. Thon und Mitarbeiter haben einen neuen Typ von Granula beschrieben, die T-Granula. Exprimiert wird bei Freisetzung dieser Granula überwiegend TLR-9. Wir untersuchten daher TLR-9 als Marker für diesen Granulatyp [94].

Um die valide Färbung der Aktivierungsparameter nachzuweisen wurde eine Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin durchgeführt und die Änderung der Aktivierungsparameter mit demselben Färbeprotokoll gemessen wie später in den Hauptexperimenten. Es ist bekannt, dass die Stimulation von Thrombozyten durch Thrombin zur erhöhten Expression von P-Selektin [149] und CD63 [150] führt. Bezüglich des TLR-9 Rezeptors ist bis dato nicht bekannt, welcher Stimulationsmechanismus zu einer verstärkten Expression führt. Daher wurde in diesem Fall keine Positivkontrolle mit Thrombin bezüglich der TLR9 Expression durchgeführt.

7.1.9 Thromboelastometrie

Eine wichtige Forschungsfrage war, ob im Setting des Traumas eine reziproke Aktivierung von CD4+ Tregs und Thrombozyten zu beobachten ist. Funktionseinschränkungen von Thrombozyten äußern sich klinisch besonders in Gerinnungsstörungen [116], die mit der Thromboelastometrie erfasst werden können. Die Thromboelastometrie gibt einen globalen Überblick über die Gerinnung, ist schnell durchführbar und vor allem klinisch bereits fest etabliert [132, 133, 193]. Der Hersteller bietet, neben den Probengefäßen (Cups)

für Humanblut, auch kleinere Cups an, die ein sehr viel geringeres Blutvolumen fassen [194]. Diese sind durch den Hersteller vorbestimmte Füllmengen zu befüllen und erlauben die Analyse von murinem Vollblut, das nicht in gleichen Mengen gewonnen werden kann wie das humane. Im murinen Modell gibt es, wie im humanen, zahlreiche Studien, die das thromboelastometrische Verfahren verwenden [195, 196].

7.2 A: Trauma führt zu früher Aktivierung von CD4+ Tregs, aber nicht von CD4+ non-Tregs (T-Effektor-Zellen)

7.2.1 Relevanz T-Zell-Rezeptor-abhängiger CD4+ Treg Aktivierung

Bereits Hanschen und Mitarbeiter konnten 2012 zeigen, dass die Stimulation mit bakteriellen Superantigenen in vivo zu einer stärkeren Aktivierung von CD4+ Tregs verglichen mit CD4+ non Tregs führt [152]. Im Setting des Traumas konnte die frühe Aktivierung von CD4+ Tregs, nicht aber von CD4+ non-Tregs, festgestellt werden. Die Kinetik und Lokalisation wurde aufgezeigt [138]. Die Daten der vorausgehenden Arbeiten konnten hier reproduziert werden und unterstreichen, dass CD4+ Tregs schnell agierende Sentinels sind. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die Aktivierung abhängig vom T-Zell-Rezeptor der CD4+ Tregs zu sein scheint, da mit ZAP-70 und PKC- θ Veränderungen der Downstream-Proteine festgestellt wurden [140-142]. In dem Versuchsaufbau wurden die Versuchstiere keinen bakteriellen Pathogenen ausgesetzt. Somit ist davon auszugehen, dass die traumatische Schädigung steriler Natur ist, also nur ein Gewebeschaden ohne Kontamination vorliegt. Im Rahmen der sterilen Inflammation wird Gewebe verletzt und verschiedenste Zellbestandteile freigesetzt, die als Auto-Antigene (self-antigen) wirken. Diese werden Damage-Associated-Molecular-Pattern (DAMPs) genannt und sind in der Lage über verschiedene Pattern-Recognition-Receptors, beispielsweise TLR-4, Zellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems zu aktivieren [197]. Ob CD4+ Tregs im Setting des Traumas via Auto-Antigenen aktiviert werden, verbleibt unklar. Die Ergebnisse dieser Versuche implizieren eine T-Zell-Rezeptor abhängige Aktivierung der CD4+ Tregs, unklar ist jedoch, ob die Hypothese der Aktivierung über Auto-Antigene zutrifft. Unser Versuchsaufbau vermag diese Frage nicht zu beantworten. Ebenso wie die mögliche Aktivierung über Alarmine oder DAMPs wird eine generelle Sensibilität von CD4+ Tregs gegenüber verschiedensten Veränderungen des zellulären Umgebungsmilieus diskutiert. So fassen Matarese und Mitarbeiter zusammen, dass CD4+ Tregs sehr viel sensibler und schneller auf Veränderungen reagieren als, CD4+ Non-Tregs [151]. Die hier gezeigten Ergebnisse stützen diese Hypothese, da nicht nur gezeigt werden konnte, dass CD4+ Tregs stärker in der frühen posttraumatischen

Phase aktiviert werden, sondern auch, dass die Basisaktivität der CD4+ Tregs teilweise signifikant höher ausfiel im Vergleich mit den CD4+ non-Tregs.

Wir stellten eine erhöhte Expression und Phosphorylierung der Downstreammoleküle des T-Zell-Rezeptors fest ((p)ZAP-70 und (p)PKC- θ). Die Daten implizieren, dass eine T-Zell-Rezeptor-Aktivierung im Setting des Traumas stattfindet. Bekannt ist, dass die Aktivierung der CD4+ Tregs im Allgemeinen zumeist T-Zell-Rezeptor-abhängig stattfindet, wie zum Beispiel von Sakaguchi und Mitarbeitern als relevant beschrieben [32]. Darüber hinaus wissen wir, dass die Aktivierung via T-Zell-Rezeptor eine MHC II-Antigenpräsentation einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) mit entsprechender Kostimulation benötigt. Es ist ferner aus der Literatur bekannt, dass CD4+ Tregs mit dendritischen Zellen interagieren. Ob die Interaktion von dendritischen Zellen und CD4+ Tregs im Setting des Traumas zur frühen Aktivierung der Zellen im Lymphknoten führt, kann unser Aufbau des Experimentes nicht beantworten. Denkbar wäre, dass Antigen-präsentierende dendritische Zellen lokal im Lymphknoten zu einer Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma beitragen. Völlige Unklarheit besteht aktuell bezüglich der Genese des Antigens, das es sich bei Trauma um ein Alloantigen-unabhängiges Ereignis handelt.

Es wird vermutet, dass die Aktivierung von CD4+ Tregs im Setting des Trauma überwiegend protektiv wirkt, wobei die Datenlage diesbezüglich nicht eindeutig ist [197]. Zum einen kontrollieren CD4+ Tregs das Immunsystem und üben immunsuppressive Effekte aus. Dieses kann als protektiv, auch im Setting des Traumas, angesehen werden. Jedoch wird für eine suffiziente Pathogenabwehr ein funktionierendes System von T-Effektor-Zellen benötigt, eine überschießende CD4+ Treg Aktivierung kann hier auch zu negativen Effekten führen [198]. In der Literatur postulieren viele Arbeiten die These, dass die Aktivierung von CD4+ Tregs nach Trauma überwiegend als protektiv anzusehen ist [23, 31].

7.2.2 Limitationen

Es ist bekannt, dass CD4+ eTregs den überwiegenden Anteil der in nicht-lymphatischem Gewebe angesiedelten CD4+ Tregs ausmachen. CD4+ cTregs exprimieren den für die Migration zum Lymphknoten relevanten Homing Rezeptor CD62L, im Gegensatz zu den vorbenannten CD4+ eTregs [55]. Es ist daher davon auszugehen, dass die hier gemessene Aktivität überwiegend von den CD4+ cTregs ausgemacht wird. Es kann an dieser Stelle keine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen CD4+ Treg-Subtypen gemacht werden und damit auch keine Einschätzung gegeben werden bezüglich der Relevanz der unterschiedlichen CD4+ Treg-Subtypen an der Immunreaktion. Darüber hinaus werden unterschiedliche CD4+ Treg-Subtypen bei Entzündungsreaktionen an den Ort der Entzündung rekrutiert [199]. Auch hierzu können die Daten keine Auskunft geben, welche Art von CD4+ Treg-Subtypen rekrutiert werden.

7.2.3 Schlussfolgerung A

CD4+ Tregs weisen generell ein höheres Aktivitätspotential auf und werden früh (2 Stunden) nach Trauma schneller aktiviert als CD4+ non-Tregs. Die frühe Aktivierung von CD4+ Tregs kann in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden, nicht jedoch systemisch. Der biologische Zweck der schnellen Aktivierung ist bis dato noch unbekannt.

7.3 B: Thrombozyten augmentieren die Aktivität von CD4+ Tregs in der frühen Phase nach Trauma

7.3.1 Neuer Regulationsmechanismus

Wie oben bereits beschrieben, findet die frühe posttraumatische Aktivierung der CD4+ Tregs beginnend nur in den drainierenden Lymphknoten statt. Wird das Verbrennungstrauma nach Thrombozytendepletion induziert, so ist in der frühen posttraumatischen Phase (2 Stunden) eine signifikante Aktivitätsminderung in den CD4+ Tregs der lokalen Lymphknoten nachweisbar. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Thrombozyten an der frühen posttraumatischen Aktivierung der CD4+ Tregs in den drainierenden Lymphknoten beteiligt sind. Erstmals konnten wir in einem murinen in vivo Verbrennungsmodell zeigen, dass die CD4+ Treg Aktivierung von Thrombozyten abhängig ist. Des Weiteren beobachteten wir, dass in den CD4+ Treg-Zellen gewonnen aus der Milz keine frühe posttraumatische Aktivierung zu beobachten ist. Allerdings sinkt auch hier bei den thrombozytendepletierten Mäusen nach Verbrennung die Aktivität der CD4+ Tregs. Wir postulieren, dass Thrombozyten die generelle Aktivität von CD4+ Tregs aufrechterhalten und diese nach Verbrennung nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Thrombozyten tragen daher vermutlich zur generellen Basisaktivität von CD4+ Tregs bei. In unseren Messungen wurden mit (p)ZAP-70 und (p)PKC- θ Downstream-Moleküle des T-Zell-Rezeptors gemessen. Die Veränderungen der TCR-Signalmoleküle lässt uns postulieren, dass die Immunantwort T-Zell-Rezeptor-abhängig erfolgt. Dies kann nach jetzigem Kenntnisstand allerdings nur vermutet werden. Über welchen Mechanismus Thrombozyten hier eingreifen, verbleibt aktuell unklar und ist Gegenstand der aktuell weitergeführten Forschung.

Es ist bekannt, dass Thrombozyten in der Regulation der Immunreaktion über die Modulation von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen. Das konnte in verschiedenen Krankheitsbildern gezeigt werden, wie zum Beispiel der Atherosklerose, Sepsis, Rheumatoider Arthritis, Transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI), Entzündungen der Haut, Akutes Nierenversagen und einigen mehr [88, 95]. Zudem wiesen Fujimi und Mitarbeiter in der Vergangenheit in einem murinen Modell auf eine erhöhte Mortalität nach Thrombozytendepletion bei Verbrennungstrauma hin [200]. Warum allerdings

Thrombozyten-depletierte Tiere anfälliger waren, konnte in dieser Studie nicht abschließend beantwortet werden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Depletion der Thrombozyten zu einer gestörten Immunregulation via unzureichender Aktivierung von CD4+ Tregs geführt haben könnte. Thrombozyten sind sehr klein, erreichen über die Blutbahn jedes Gewebe, sind ubiquitär präsent und sind über die Freisetzung ihrer Granula in der Lage schnell auf äußere Einflüsse zu reagieren. Es ist daher – und aufgrund der immer mehr zunehmenden Erkenntnis über ihre immunomodulatorischen Funktionen – naheliegend, ihnen eine Wächterfunktion im Immunsystem zuzuschreiben [88, 95, 113]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützten diese Ansicht. CD4+ Tregs wirken protektiv im Rahmen der posttraumatischen Immunantwort [23, 25, 31] und Thrombozyten nehmen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der CD4+ Tregs ein. Dabei liegt der Schwerpunkt der Aktivierung auf der frühen posttraumatischen Phase, da diese später nicht zu beobachten ist.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass im septischen und anderweitig intensivpflichtigen Patienten die Thrombozytopenie mit einer gesteigerten Mortalität einhergeht [113]. Darüber hinaus geht die beeinträchtigte thrombozytäre Funktion mit einer Verschlechterung des klinischen Zustands bei Sepsis, Akuter Lungeninsuffizienz, MODS und Multiorganversagen einher [113]. Neben einer gestörten Gerinnungsfunktion vermuten wir, dass eine mangelhafte Immunregulation durch fehlende CD4+ Treg-Aktivierung durch Thrombozyten mitverantwortlich für ein schlechteres Outcome sein könnte.

7.3.2 Unterschiede der thrombozytären Stimulusantwort, sowie Limitationen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten in der frühen posttraumatischen Phase die immunsuppressive Funktion der CD4+ Tregs unterstützen und damit selbst indirekt immunsuppressiv wirken. Es liegen Studien vor, die hauptsächlich pro-inflammatorische Funktionen von Thrombozyten beobachteten [103, 201]. Hier beschreiben wir erstmals eine protektive Funktion von Thrombozyten im Setting des Traumas, vermittelt über die augmentierte Aktivierung von CD4+ Tregs.

Thrombozyten sind klein und zellkernlos, sind aber erstaunlicherweise dennoch in der Lage in begrenztem Maße Proteine de novo zu synthetisieren [95]. Zu einer langanhaltenden immunomodulierenden Antwort sind sie jedoch damit nicht in der Lage. Dazu sind die Granula zu schnell entleert und die Synthesekapazität zu begrenzt. Zudem gewährleisten sie vor allem eine suffiziente Hämostase. Thrombozyten zeichnen sich durch eine hämostaseologische Funktion und eine immunomodulierende Funktion aus und sind in Ihrer Anzahl begrenzt. In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen konnten wir hier zeigen, dass im Setting des Traumas immunologische sowie die hämostaseologischen Funktionen der Thrombozyten zu tragen kommen [95, 192].

7.3.3 Schlussfolgerung B

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten in der Lage sind die frühe posttraumatische Immunantwort von CD4+ Tregs zu augmentieren. Dieser Effekt ist nur lokal in den drainierenden Lymphknoten zu beobachten. Systemisch scheinen Thrombozyten die generelle Aktivität der CD4+ Tregs zu unterstützen. Damit lassen sich Thrombozyten genauer in ihrer immunomodulatorischen Funktion einordnen und bieten eine Erklärung für ihre protektive Rolle nach Trauma. Zudem wird die Ansicht, dass sie als Wächter des Immunsystems schnell auf Inflammation reagieren können, bestätigt. Dieser Zusammenhang erweitert das Verständnis der posttraumatischen Regulation der CD4+ Tregs, welches bislang weitestgehend unbekannt war.

7.4 C: Thrombozytendepletion führt zu keiner Veränderung der Aktivierung von CD4+ Tregs in einer späten Phase nach Trauma

7.4.1 Begründung der Notwendigkeit der schnellen Funktion der CD4+ Tregs

Im Gegensatz zur Modulation der Aktivierung der CD4+ Tregs durch Thrombozyten in der frühen posttraumatischen Phase konnte in der späten posttraumatischen Phase nach 7 Tagen keine Veränderung der CD4+ Treg-Aktivität gemessen werden. Das experimentelle Setting unterschied sich von dem der frühen posttraumatischen Experimente. ZAP-70 und PKC- θ sind sehr rasch aktivierte Downstream-Moleküle des T-Zell-Rezeptors und eignen sich daher zur Detektion von sehr früher Aktivität [140-142]. Für die Aktivitätsmessung nach 7 Tagen erscheinen längerfristig exprimierte Rezeptoren sinnvoll. Der Fokus lag darauf zu beobachten, ob eine längerfristige Aktivierung der Zellen beibehalten wird, oder ob CD4+ Tregs ihren hohen Aktivitätsstatus schnell wieder verlieren, wie zum Beispiel von Matarese und Mitarbeitern vermutet wird [151]. Bezüglich der Wahl des späten posttraumatischen Untersuchungszeitraums haben wir uns an den Daten von Gunst und Mitarbeitern orientiert, die in der späten posttraumatischen Phase einen leichten Anstieg der Mortalität nach etwa 1-2 Wochen verzeichnen konnten, der potentiell auf immunologische Einflüsse zurückzuführen ist [188].

Interessanterweise konnten wir bei keinem der Aktivierungsparameter eine signifikante Veränderung der Aktivität gegenüber dem Ausgang feststellen, weder für die CD4+ Tregs gewonnen aus den drainierenden Lymphknoten, noch für die aus der Milz. Es ließen sich auch keine Unterschiede zwischen Scheininterventions- und Verbrennungstraumagruppen innerhalb der Kontroll- bzw. Depletionsgruppe feststellen. Das legt die Vermutung nahe, dass CD4+ Tregs nach einem Zeitraum bis spätestens 7 Tagen wieder in ihren ursprünglichen Aktivitätszustand zurückkehren. Dabei besteht die Möglichkeit, dass CD4+ non-Tregs durch Clusterbildung über einen längeren Zeitraum in der Lage sind CD4+ Tregs von dem für sie

relevanten IL-2 abzuschneiden [55]. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Ni Choileain und Mitarbeiter, diese haben in einem Experiment die Potenz von CD4+ Tregs 7 Tage nach Scheinintervention und Verbrennungstrauma gemessen. Sie konnten zeigen, dass die CD4+ Tregs 7 Tage nach Trauma potenter die Proliferation von CD4+ T-Effektor-Zellen unterdrücken als die CD4+ Tregs nach Scheinintervention [202]. Ni Choileain und Mitarbeiter haben dabei die Zellen 7 Tage nach Intervention isoliert, Antikörper-vermittelt stimuliert und konnten nach Verbrennungstrauma eine erhöhte Produktion von IL-10 bei CD4+ Tregs der drainierenden Lymphknoten feststellen. Daraus haben die Autoren geschlossen, dass CD4+ Tregs gewonnen aus lokalen Lymphknoten und nicht aus der Milz verstärkt suppressiv wirken. Interessanterweise beschreiben sie, dass keine signifikante Veränderung bei der Expression von den Oberflächenmarkern TLR4-MD-2, CD45RB, GITR, CD62L und CD69 gemessen werden konnte (in deren Paper als unveröffentlichte Ergebnisse bezeichnet) [202]. Das deckt sich mit den hier gewonnenen Ergebnissen, da die letzten drei Parameter (GITR, CD62L und CD69) ebenfalls in der Isotypkontrollgruppe (also ohne Thrombozytendepletion) gemessen wurden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die späte Aktivität von CD4+ Tregs in dem Versuch verändert war, aber dies nicht an den gewählten Aktivitätsmarkern ablesbar sein konnte.

Wesentlich im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen ist die Frage, warum sich die Interaktion zwischen CD4+ Tregs und Thrombozyten früh (2 Stunden) und spät (7 Tage) nach Trauma so unterscheiden. Wie bereits im Kapitel zuvor (7.3) ist auf die begrenzte thrombozytäre Reaktionsmöglichkeit hinzuweisen. Dies scheint sich hier zu bestätigen, da spät keine Modulation der CD4+ Treg-Aktivität mehr beobachtet werden kann. Zudem ist es möglich, dass sich die Anzahl der Thrombozyten im Laufe der 7 Tage erholt haben könnten. In den Experimenten wurden die Thrombozyten einmalig depletiert und eine Konstanz der Anzahl der Thrombozyten nicht überwacht.

7.4.2 Limitationen

Aufgrund begrenzter Versuchstiere war es in den Vorexperimenten nicht möglich eine zeitliche Studie zur Dauer der Thrombozytendepletion nach einmaliger Zufuhr des Depletionsserums durchzuführen. Es liegen jedoch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen vor, die mit demselben Depletionsserum gearbeitet haben und eine mindestens 3 Tage anhaltende Depletion beschreiben konnten [163]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ein potentiell vorhanden gewesener Effekt nach 7 Tagen nicht mehr messbar war, da sich die Thrombozytenzahlen erholt haben.

7.4.3 Schlussfolgerung C

Thrombozyten beeinflussen nicht die späte (7 Tage) posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs. Dabei ist zu beachten, dass eine Rekonstitution der Thrombozytenzahlen im Verlauf nicht ausgeschlossen werden kann, die möglicherweise einen solchen Effekt maskiert.

7.5 D: CD4+ Tregs beeinflussen nicht die Expression von Aktivierungsparametern der Thrombozyten

7.5.1 Keine Veränderung bei P-Selektin, CD63 und TLR-9: Divergenz der Expression und Hämostase?

Entsprechend der Fragestellung, ob Thrombozyten die posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs beeinflussen, entstand die Frage, ob dieser Effekt reziprok, also auch umgekehrt, zu beobachten ist. Dazu wurde mit derselben Vorstellung, wie in Fragestellung B und C vorgegangen. Der betreffende Zelltyp, dieses Mal CD4+ Tregs, wurde depletiert, ein Verbrennungstrauma induziert und anschließend die Aktivität des andern Zelltyps, also hier der Thrombozyten, im Vergleich zu den nicht-depletierten Gruppen gemessen. Die posttraumatische Aktivität der Thrombozyten wurde anhand der Marker P-Selektin (CD62P), CD63 und TLR-9 gemessen. Die Wahl fiel auf diese Marker, da die Expression überwiegend an bestimmte Granula gebunden ist und so eine diverse Granulafreisetzung detektiert werden konnte. In der Literatur finden sich Hinweise, dass P-Selektin (CD62P) überwiegend aus α -Granula freigesetzt wird [148], CD63 überwiegend aus den Elektronendichten Granula [148, 192] und TLR-9 aus den T-Granula [94]. Dabei gibt es allerdings hinsichtlich der Ausschüttung und Expression von CD63 und P-Selektin (CD62P) Überschneidungen [148, 192].

Interessanterweise konnten keine Veränderung in der Expression der gewählten Aktivierungsparameter beobachtet werden, weder nach 2 Stunden, noch nach 7 Tagen. Dazu gilt es zu erwähnen, dass der signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach Verbrennungstrauma (Kontrollgruppe und CD4+ Treg-Depletionsgruppe) im Rahmen eines Ausreißers in der Kontrollgruppe von uns gewertet wurde. Obschon keine Veränderung der Aktivierungsparameter auf Thrombozyten festgestellt wurde, konnte -wie in 6.6 beschrieben- eine Veränderung in der Thrombozyten-vermittelten Hämostase beobachtet werden. In diesem Zusammenhang erscheint die Studie von Yaguchi und Mitarbeiter interessant [203]. Die Autoren haben in septischen Patienten die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten und die Expression verschiedener Adhäsionsproteine untersucht, unter anderem P-Selektin (CD62P). Dabei konnten sie feststellen, dass die Aggregationsfähigkeit herabgesetzt war. Die Expression der gemessenen Oberflächenrezeptoren, u.a. P-Selektin (CD62P), zeigte sich nicht signifikant verändert [203]. Es erscheint

somit plausibel, dass auch in unserem Modell der sterilen Inflammation die Expression von Aktivitätsmarkern der Thrombozyten nicht korreliert. [157]

7.5.2 Limitationen

Wie bereits in der Methodendiskussion beschrieben, findet bei der Depletion mittels PC-61 keine vollständige Depletion der CD4+ Tregs statt, allerdings eine deutliche Reduktion. Das bedeutet, dass eine gewisse Interaktion zwischen den restlichen vorhandenen CD4+ Tregs und Thrombozyten stattgefunden haben kann, die einen potentiell vorhandenen Effekt verschleiert. Besonders nach 7d ist theoretisch eine Erholung der CD4+ Treg-Zahlen im peripheren Blut möglich. Da, wie in 7.1.2 beschrieben, in der Literatur jedoch von einer suffizienten Depletion über mindestens 2 Wochen ausgegangen wird, halten wir das für sehr unwahrscheinlich. Den Anteil der CD4+ Tregs an allen CD4+T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten, sowie der Milz wurde gemessen und die anhaltende Reduktion der CD4+ Tregs nachgewiesen.

7.5.3 Schlussfolgerung D

Die Depletion von CD4+ Tregs hatte keine Veränderung in der Expression der Aktivitätsmarker P-Selektin (CD62P), CD63 und TLR-9 zur Folge. Dabei steht jeder der Rezeptoren für die Freisetzung einer bestimmten Ganulaform (P-Selektin (CD62P) für α -Granula, CD63 für Elektronendichte Granula und TLR-9 für T-Granula). Da CD4+ Tregs, wie in 7.6 beschrieben, einen Einfluss auf die Thrombozyten-vermittelte Hämostase haben, besteht die Vermutung, dass die hämostatische Funktion und die Expression der genannten Rezeptoren bei Aktivierung divergieren. Dies konnte bereits in septischen Patienten beobachtet werden [203].

7.6 E: CD4+ Tregs beeinflussen die Thrombozyten-vermittelte Hämostase in der frühen Phase nach Trauma

7.6.1 Hyperkoagulation nach Verbrennungstrauma im humanen und murinen Setting

Wie bereits in 7.3 gezeigt sind Thrombozyten in der Lage die Aktivität der CD4+ Tregs zu beeinflussen. Um der Frage nachzugehen, ob dieser Effekt auch reziprok stattfindet, haben wir zum einen die Aktivierungsparameter auf Thrombozyten gemessen. Da allerdings bis heute nicht sicher bekannt ist, welche Rolle diese spielen [203], war es notwendig ein etabliertes Verfahren anzuwenden um Veränderungen im thrombozytären Verhalten messen zu können. Dabei bietet sich die Thromboelastometrie an, die es zum einen ermöglicht einen umfassenden Überblick über den Gerinnungsstatus von Mensch und Versuchstier zu liefern und zum andern klinisch fest etabliert ist [133].

Es ist bekannt, dass Verbrennungen im humanen Setting zu einem hyperkoagulativen Zustand führen, wobei der genaue Beginn der Hyperkoagulation umstritten ist [204, 205]. Im murinen Modell wurden die klinischen Erfahrungen aufgegriffen und es konnte auch hier gezeigt werden, dass sich die Tiere nach thermischen Trauma in einem hyperkoagulativen Zustand befinden und die Thrombozytenaktivität gesteigert ist [206]. Von Interesse war, ob sich an der Gerinnung abhängig von der An- oder Abwesenheit von CD4+ Tregs Änderungen zeigen.

7.6.2 Unterschiede in der hämostatischen Funktion der Thrombozyten nach CD4+ Treg-Depletion nach 2h

Generell zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Clot-Formation-Time, die den Beginn der festen Gerinnselfbildung abbildet, sowie dem α -Angle, der die Geschwindigkeit der Gerinnselfbildung repräsentiert. Zudem fällt auf, dass bei den Mäusen, die den Kontrollantikörper HRPN gespritzt bekamen, kein Unterschied zwischen Sham und Burn Gruppe nachweisbar ist. Erklären lässt sich dies, da humane Arbeiten zeigen, dass Änderungen der Hämostase erst im Verlauf auftreten [204]. Es ist daher naheliegend, dass auch hier im murinen Modell erst nach einiger Zeit ein hyperkoagulativer Zustand eintritt. Es ist daher umso interessanter, dass ein geändertes hämostatisches Verhalten in der CD4+ Treg-Depletionsgruppe beobachtet werden konnte. Vergleicht man die Sham mit der Burn Gruppe innerhalb der CD4+ Treg-Depletionsgruppe, so zeigt sich, dass die Gerinnselfestigkeit nach Verbrennungstrauma abnimmt. Repräsentiert wird dies durch die Parameter A5-30 und MCF (der Gerinnselfestigkeit zu bestimmten Zeitpunkten, sowie der maximalen Gerinnselfestigkeit). Dabei gilt es allerdings zu sagen, dass sich die Unterschiede nicht signifikant darstellen. Die Tatsache, dass sich der hämostatische Zustand von einem erwarteten hyper-koagulativen in einen hypo-koagulativen Zustand verwandelt, spricht dafür, dass die Abwesenheit von CD4+ Tregs zu einer Veränderung der Gerinnung führt.

7.6.3 Keine Änderung der hämostatischen Funktion der Thrombozyten nach CD4+ Treg-Depletion nach 7d

Anders als nach 2h zeigt sich auch nach 7d ein signifikanter Unterschied in der Clot-Formation-Time zwischen der Scheininterventionsgruppe (Sham) und der Verbrennungsgruppe (Burn) innerhalb der CD4+ Treg-Depletionsgruppe. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigt sich dieselbe Tendenz. Zusammengenommen mit dem α -Angle, der nach Verbrennung bei der Kontrollgruppe und der CD4+ Treg-Depletionsgruppe steiler ist, lässt sich anhand der Daten beschreiben, dass ein hyperkoagulativer Zustand nach Verbrennung vorliegt, unabhängig davon ob CD4+ Tregs depletiert wurden oder nicht. Dieselbe Tendenz ergibt sich aus den Daten von A5-30, beziehungsweise MCF. Diese Daten bestätigen, die in der Literatur beschriebene

Hyperkoagulation nach thermischem Trauma [206]. Schlussfolgend, CD4+ Tregs beeinflussen die hämostatische Funktion der Thrombozyten in der späten posttraumatischen Phase nach Trauma nicht.

7.6.4 Limitationen

Wie in 7.1.27.1.2 bereits beschrieben, wurde die Depletion der CD4+ Tregs durch PC-61 nicht über den gesamten Zeitraum beobachtet. Es ist somit theoretisch eine Erholung im peripheren Blut möglich, jedoch unwahrscheinlich. In Milz und drainierenden Lymphknoten konnte die Depletion nachgewiesen werden.

7.6.5 Schlussfolgerung E

Mit dieser Arbeit konnte nicht nur zum ersten Mal gezeigt werden, dass Thrombozyten in der Lage sind die Aktivität der CD4+ Tregs in der frühen posttraumatischen Phase zu beeinflussen, sondern auch dass dieser Effekt reziprok stattfindet. Durch die veränderte hämostatische Funktion der Thrombozyten in der frühen (2h) posttraumatischen Phase nach CD4+ Treg-Depletion wurde dies deutlich. In der späten posttraumatischen Phase (7d) konnte dies nicht gezeigt werden. Es lässt sich daher schließen, dass CD4+ Tregs die frühe hämostatische Funktion der Thrombozyten nach Trauma beeinflussen.

8 Schlussfolgerung

8.1 Relevante Erkenntnisse aus dieser Arbeit: Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten die Aktivierung von CD4+ Tregs in der frühen post-traumatischen Phase positiv beeinflussen. Dieser Effekt ist reziprok.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Thrombozyten die frühe posttraumatische Aktivierung von CD4+ Tregs verstärken. Aus der Literatur wird immer deutlicher, dass Thrombozyten relevante immunologische Funktionen haben und aufgrund ihrer Omnipräsenz, sowie ihrer zahlenmäßig hohen Verfügbarkeit, eine Wächterrolle im Immunsystem übernehmen. Diese Arbeit unterstützt diese Sichtweise auf Thrombozyten. Relevant sind die hier beschriebenen Erkenntnisse deswegen, da die CD4+ Tregs eine wesentliche Rolle in der physiologischen Immunsuppression, dem CARS, einnehmen. Mit dieser Arbeit wird ein neuer Steuerungsmechanismus der Immunregulation nach Trauma aufgedeckt. Thrombozyten beeinflussen die frühe posttraumatische Aktivität der CD4+ Tregs positiv. Interessant ist dabei, dass der Effekt reziprok ist. CD4+ Tregs beeinflussen die posttraumatische Hämostase.

8.2 Notwendige zu bearbeitende anschließende Fragestellungen: Mechanismen der Interaktion

Die in der vorliegenden Arbeit adressierte Fragestellung belief sich auf die Klärung, ob eine Interaktion zwischen Thrombozyten und CD4+Tregs stattfindet oder nicht. Nachdem geklärt werden konnte, dass dieser Effekt reziprok vorhanden ist, stellt sich die Frage, welche Mechanismen diese Interaktion vermitteln. Diese Fragestellungen werden in zukünftigen Experimenten adressiert.

8.3 Ausblick in die Klinik: Diagnostische und therapeutische Möglichkeiten

Bis heute ist es der modernen Medizin nicht gelungen, die immunologischen Folgen nach Trauma adäquat zu erforschen und therapieren. Die vorhandenen Ergebnisse stellen einen Grundstein für weitere Untersuchungen dar, mit dem Ziel die Diagnostik und Therapie der immunologischen Dysbalance nach Trauma weiter aufzuklären. Anhand der Interaktionen zwischen Thrombozyten und CD4+ Tregs könnte diagnostisch das Outcome in Traumapatienten abgeschätzt werden, Risikopatienten könnten frühzeitig identifiziert werden. Therapeutisch wäre denkbar mittels Immunomodulation Thrombozyten zu beeinflussen, um Dysbalancen im Immunsystem zu verhindern.

9 Literaturverzeichnis

- [1] M. P. H. a. R. S. H. Esther Hing, Ph.D, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. (2011, 10. August 2018). *Community Health Centers: Providers, Patients, and Content of Care* Available: <https://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db65.pdf>
- [2] D. f. t. M. o. N. D. World Health Organization, Disability, Violence and Injury Prevention (2014, 10. August 2018). *Injuries and violence: the facts 2014*. Available: http://www.who.int/violence_injury_prevention/media/news/2015/Injury_violence_facts_2014/en/
- [3] H. Tscherne, G. Regel, J. A. Sturm, and H. P. Friedl, "[Degree of severity and priorities in multiple injuries]," *Chirurg*, vol. 58, no. 10, pp. 631-40, Oct 1987. Schweregrad und Prioritäten bei Mehrfachverletzungen.
- [4] S. Wutzler, T. Lustenberger, B. Relja, M. Lehnert, and I. Marzi, "[Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]," *Chirurg*, vol. 84, no. 9, pp. 753-8, Sep 2013. Pathophysiologie des Polytraumas : Intensivmedizin und "Timing" der Versorgung.
- [5] J. Sobrino and S. Shafi, "Timing and causes of death after injuries," *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, vol. 26, no. 2, pp. 120-3, Apr 2013.
- [6] L. Hoover *et al.*, "Systemic inflammatory response syndrome and nosocomial infection in trauma," *J Trauma*, vol. 61, no. 2, pp. 310-6; discussion 316-7, Aug 2006.
- [7] C. Neunaber *et al.*, "Immunomodulation in polytrauma and polymicrobial sepsis - where do we stand?," *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, vol. 5, no. 1, pp. 17-25, Jan 2011.
- [8] V. Ciriello, S. Gudipati, P. Z. Stavrou, N. K. Kanakaris, M. C. Bellamy, and P. V. Giannoudis, "Biomarkers predicting sepsis in polytrauma patients: Current evidence," *Injury*, vol. 44, no. 12, pp. 1680-92, Dec 2013.
- [9] H. B. Sapan *et al.*, "Pattern of cytokine (IL-6 and IL-10) level as inflammation and anti-inflammation mediator of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in polytrauma," *Int J Burns Trauma*, vol. 6, no. 2, pp. 37-43, 2016.
- [10] H. Ding, X. Y. Cao, X. G. Ma, and W. J. Zhou, "Endothelial cell injury with inflammatory cytokine and coagulation in patients with sepsis," *World J Emerg Med*, vol. 4, no. 4, pp. 285-9, 2013.
- [11] S. Hirsiger, H. P. Simmen, C. M. Werner, G. A. Wanner, and D. Rittirsch, "Danger signals activating the immune response after trauma," *Mediators Inflamm*, vol. 2012, p. 315941, 2012.
- [12] M. Keel and O. Trentz, "Pathophysiology of polytrauma," *Injury*, vol. 36, no. 6, pp. 691-709, Jun 2005.
- [13] S. B. Flohe, S. Flohe, and F. U. Schade, "Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms," *Innate Immun*, vol. 14, no. 6, pp. 333-44, Dec 2008.
- [14] M. Singer *et al.*, "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)," (in eng), *Jama*, vol. 315, no. 8, pp. 801-10, Feb 23 2016.
- [15] W. M. Dunne, Jr., "Laboratory Diagnosis of Sepsis? No SIRS, Not Just Yet," *J Clin Microbiol*, vol. 53, no. 8, pp. 2404-9, Aug 2015.
- [16] M. E. Andrades, A. Morina, S. Spasic, and I. Spasojevic, "Bench-to-bedside review: sepsis - from the redox point of view," *Crit Care*, vol. 15, no. 5, p. 230, 2011.
- [17] A. Oberholzer, C. Oberholzer, and L. L. Moldawer, "Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity," (in Eng), *Shock*, vol. 16, no. 2, pp. 83-96, Aug 2001.
- [18] H. H. Versteeg, J. W. Heemskerk, M. Levi, and P. H. Reitsma, "New fundamentals in hemostasis," *Physiol Rev*, vol. 93, no. 1, pp. 327-58, Jan 2013.
- [19] A. L. Parke, P. T. Liu, and D. V. Parke, "Multiple organ dysfunction syndrome," *Inflammopharmacology*, vol. 11, no. 1, pp. 87-95, 2003.

- [20] D. G. f. U. D. Prof. Dr. Rolf Lefering (IFOM) in Zusammenarbeit mit Ulrike Nienaber (AUC), Sektion Intensiv- & Notfallmedizin, Schwerverletztenversorgung (NIS) und AUC - Akademie der Unfallchirurgie GmbH (2016, 10. August 2018). *TraumaRegister DGU® Jahresbericht 2016* Available: http://www.traumaregister-dgu.de/fileadmin/user_upload/traumaregister-dgu.de/docs/Downloads/TR-DGU-Jahresbericht_2016.pdf
- [21] R. C. Bone, "Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)," (in Eng), *Ann Intern Med*, vol. 125, no. 8, pp. 680-7, Oct 15 1996.
- [22] R. S. Hotchkiss, G. Monneret, and D. Payen, "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy," *Nat Rev Immunol*, vol. 13, no. 12, pp. 862-74, Dec 2013.
- [23] T. J. Murphy, N. Ni Choileain, Y. Zang, J. A. Mannick, and J. A. Lederer, "CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury," *J Immunol*, vol. 174, no. 5, pp. 2957-63, Mar 1 2005.
- [24] N. S. Ward, B. Casserly, and A. Ayala, "The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients," *Clin Chest Med*, vol. 29, no. 4, pp. 617-25, viii, Dec 2008.
- [25] C. Cao, T. Ma, Y. F. Chai, and S. T. Shou, "The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis," (in Eng), *World J Emerg Med*, vol. 6, no. 1, pp. 5-9, 2015.
- [26] K. N. Couper, D. G. Blount, and E. M. Riley, "IL-10: the master regulator of immunity to infection," *J Immunol*, vol. 180, no. 9, pp. 5771-7, May 1 2008.
- [27] F. Venet *et al.*, "Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes," (in Eng), *Crit Care Med*, vol. 32, no. 11, pp. 2329-31, Nov 2004.
- [28] N. Wisnoski, C. S. Chung, Y. Chen, X. Huang, and A. Ayala, "The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis," (in Eng), *Shock*, vol. 27, no. 3, pp. 251-7, Mar 2007.
- [29] A. L. Taylor and M. J. Llewelyn, "Superantigen-induced proliferation of human CD4+CD25- T cells is followed by a switch to a functional regulatory phenotype," (in Eng), *J Immunol*, vol. 185, no. 11, pp. 6591-8, Dec 1 2010.
- [30] J. G. Heuer *et al.*, "Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis," (in Eng), *J Immunol*, vol. 174, no. 11, pp. 7141-6, Jun 1 2005.
- [31] C. M. Robertson and C. M. Coopersmith, "The systemic inflammatory response syndrome," (in Eng), *Microbes Infect*, vol. 8, no. 5, pp. 1382-9, Apr 2006.
- [32] S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler, "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 7, pp. 490-500, Jul 2010.
- [33] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "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*, vol. 155, no. 3, pp. 1151-64, Aug 1 1995.
- [34] K. Mnasria, C. Lagaraine, F. Velge-Roussel, R. Oueslati, Y. Lebranchu, and C. Baron, "Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells," *J Leukoc Biol*, vol. 84, no. 2, pp. 460-7, Aug 2008.
- [35] S. Letourneau, C. Krieg, G. Pantaleo, and O. Boyman, "IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets," *J Allergy Clin Immunol*, vol. 123, no. 4, pp. 758-62, Apr 2009.
- [36] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057-61, Feb 14 2003.
- [37] R. Khattri, T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell, "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells," *Nat Immunol*, vol. 4, no. 4, pp. 337-42, Apr 2003.

- [38] J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells," *Nat Immunol*, vol. 4, no. 4, pp. 330-6, Apr 2003.
- [39] C. L. Bennett *et al.*, "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3," *Nat Genet*, vol. 27, no. 1, pp. 20-1, Jan 2001.
- [40] H. Yagi *et al.*, "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells," *Int Immunol*, vol. 16, no. 11, pp. 1643-56, Nov 2004.
- [41] C. Benoist and D. Mathis, "Treg cells, life history, and diversity," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, no. 9, p. a007021, Sep 2012.
- [42] H. Zhang, H. Kong, X. Zeng, L. Guo, X. Sun, and S. He, "Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy," *J Transl Med*, vol. 12, p. 125, 2014.
- [43] K. G. Schmetterer, A. Neunkirchner, and W. F. Pickl, "Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation," *FASEB J*, vol. 26, no. 6, pp. 2253-76, Jun 2012.
- [44] Y. Belkaid and G. Oldenhove, "Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells," *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 362-71, Sep 19 2008.
- [45] R. A. Peterson, "Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression," (in eng), *Toxicol Pathol*, vol. 40, no. 2, pp. 186-204, 2012.
- [46] J. H. Buckner and S. F. Ziegler, "Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery," (in eng), *Arthritis Res Ther*, vol. 6, no. 5, pp. 215-22, 2004.
- [47] A. K. Abbas *et al.*, "Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature," *Nat Immunol*, vol. 14, no. 4, pp. 307-8, Apr 2013.
- [48] H. von Boehmer *et al.*, "Thymic selection revisited: how essential is it?," (in eng), *Immunol Rev*, vol. 191, pp. 62-78, Feb 2003.
- [49] B. Seddon and D. Mason, "Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity," (in eng), *J Exp Med*, vol. 189, no. 5, pp. 877-82, Mar 01 1999.
- [50] B. D. Sather *et al.*, "Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease," *J Exp Med*, vol. 204, no. 6, pp. 1335-47, Jun 11 2007.
- [51] W. A. Goodman and T. T. Pizarro, "Regulatory cell populations in the intestinal mucosa," (in eng), *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 29, no. 6, pp. 614-20, Nov 2013.
- [52] R. Sanchez Rodriguez *et al.*, "Memory regulatory T cells reside in human skin," *J Clin Invest*, vol. 124, no. 3, pp. 1027-36, Mar 2014.
- [53] D. A. Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, "How regulatory T cells work," *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 7, pp. 523-32, Jul 2008.
- [54] E. M. Shevach, "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 636-45, May 2009.
- [55] D. J. Campbell, "Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis," *J Immunol*, vol. 195, no. 6, pp. 2507-13, Sep 15 2015.
- [56] R. Setoguchi, S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi, "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*, vol. 201, no. 5, pp. 723-35, Mar 7 2005.
- [57] O. Boyman and J. Sprent, "The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system," *Nat Rev Immunol*, vol. 12, no. 3, pp. 180-90, Mar 2012.
- [58] C. E. Tadokoro *et al.*, "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo," *J Exp Med*, vol. 203, no. 3, pp. 505-11, Mar 20 2006.
- [59] M. Caridade, L. Graca, and R. M. Ribeiro, "Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models," (in eng), *Front Immunol*, vol. 4, p. 378, Nov 18 2013.
- [60] W. J. Grossman, J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley, "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death," *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 589-601, Oct 2004.

- [61] D. M. Zhao, A. M. Thornton, R. J. DiPaolo, and E. M. Shevach, "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes," *Blood*, vol. 107, no. 10, pp. 3925-32, May 15 2006.
- [62] R. E. Hoeppli, D. Wu, L. Cook, and M. K. Levings, "The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome," *Front Immunol*, vol. 6, p. 61, 2015.
- [63] X. Valencia, G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach, and P. E. Lipsky, "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells," (in eng), *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 253-61, Jul 01 2006.
- [64] X. Chen, M. Baumel, D. N. Mannel, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim, "Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 179, no. 1, pp. 154-61, Jul 01 2007.
- [65] A. Schneider *et al.*, "In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling," (in eng), *Sci Transl Med*, vol. 5, no. 170, p. 170ra15, Jan 30 2013.
- [66] D. Saadoun *et al.*, "Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 365, no. 22, pp. 2067-77, Dec 01 2011.
- [67] M. Rosenzweig *et al.*, "Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients," (in eng), *J Autoimmun*, vol. 58, pp. 48-58, Apr 2015.
- [68] K. S. Smigiel *et al.*, "CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets," (in eng), *J Exp Med*, vol. 211, no. 1, pp. 121-36, Jan 13 2014.
- [69] A. L. Szymczak-Workman, C. J. Workman, and D. A. Vignali, "Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress," *J Immunol*, vol. 182, no. 9, pp. 5188-92, May 1 2009.
- [70] S. K. Lathrop, N. A. Santacruz, D. Pham, J. Luo, and C. S. Hsieh, "Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population," (in eng), *J Exp Med*, vol. 205, no. 13, pp. 3105-17, Dec 22 2008.
- [71] S. K. Lathrop *et al.*, "Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota," (in eng), *Nature*, vol. 478, no. 7368, pp. 250-4, Sep 21 2011.
- [72] L. Fohse *et al.*, "High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 41, no. 11, pp. 3101-13, Nov 2011.
- [73] S. Fisson *et al.*, "Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state," *J Exp Med*, vol. 198, no. 5, pp. 737-46, Sep 1 2003.
- [74] L. S. Walker, A. Chodos, M. Eggena, H. Dooms, and A. K. Abbas, "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo," *J Exp Med*, vol. 198, no. 2, pp. 249-58, Jul 21 2003.
- [75] K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig, and H. von Boehmer, "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen," *Nat Immunol*, vol. 6, no. 12, pp. 1219-27, Dec 2005.
- [76] N. Arpaia *et al.*, "Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation," (in eng), *Nature*, vol. 504, no. 7480, pp. 451-5, Dec 19 2013.
- [77] J. P. Riddel, Jr., B. E. Aouizerat, C. Miaskowski, and D. P. Lillicrap, "Theories of blood coagulation," (in Eng), *J Pediatr Oncol Nurs*, vol. 24, no. 3, pp. 123-31, May-Jun 2007.
- [78] D. B. Brewer, "Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet," (in Eng), *Br J Haematol*, vol. 133, no. 3, pp. 251-8, May 2006.
- [79] B. Engelmann and S. Massberg, "Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity," *Nat Rev Immunol*, vol. 13, no. 1, pp. 34-45, Jan 2013.
- [80] O. Garraud, H. Hamzeh-Cognasse, B. Pozzetto, J. M. Cavaillon, and F. Cognasse, "Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions - new clues for immunopathology?," (in Eng), *Crit Care*, vol. 17, no. 4, p. 236, Aug 27 2013.
- [81] C. Deppermann and P. Kubers, "Platelets and infection," (in Eng), *Semin Immunol*, Oct 18 2016.

- [82] F. Cognasse *et al.*, "The Inflammatory Role of Platelets via Their TLRs and Siglec Receptors," (in Eng), *Front Immunol*, vol. 6, p. 83, 2015.
- [83] F. Morello, A. Perino, and E. Hirsch, "Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system," (in Eng), *Cardiovasc Res*, vol. 82, no. 2, pp. 261-71, May 1 2009.
- [84] T. Kawai and S. Akira, "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors," (in Eng), *Nat Immunol*, vol. 11, no. 5, pp. 373-84, May 2010.
- [85] C. R. Raetz and C. Whitfield, "Lipopolysaccharide endotoxins," *Annu Rev Biochem*, vol. 71, pp. 635-700, 2002.
- [86] G. Zhang *et al.*, "Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway," (in eng), *J Immunol*, vol. 182, no. 12, pp. 7997-8004, Jun 15 2009.
- [87] S. R. Clark *et al.*, "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood," *Nat Med*, vol. 13, no. 4, pp. 463-9, Apr 2007.
- [88] J. W. Semple, J. E. Italiano, Jr., and J. Freedman, "Platelets and the immune continuum," *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 4, pp. 264-74, Apr 2011.
- [89] P. Blair and R. Flaumenhaft, "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates," (in eng), *Blood Rev*, vol. 23, no. 4, pp. 177-89, Jul 2009.
- [90] M. M. Frojmovic and J. G. Milton, "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease," (in eng), *Physiol Rev*, vol. 62, no. 1, pp. 185-261, Jan 1982.
- [91] D. Duerschmied, C. Bode, and I. Ahrens, "Immune functions of platelets," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 112, no. 4, pp. 678-91, Oct 2014.
- [92] J. D. McFadyen and Z. S. Kaplan, "Platelets are not just for clots," (in eng), *Transfus Med Rev*, vol. 29, no. 2, pp. 110-9, Apr 2015.
- [93] S. M. King and G. L. Reed, "Development of platelet secretory granules," (in eng), *Semin Cell Dev Biol*, vol. 13, no. 4, pp. 293-302, Aug 2002.
- [94] J. N. Thon *et al.*, "T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling," *J Cell Biol*, vol. 198, no. 4, pp. 561-74, Aug 20 2012.
- [95] J. M. Herter, J. Rossaint, and A. Zarbock, "Platelets in inflammation and immunity," *J Thromb Haemost*, vol. 12, no. 11, pp. 1764-75, Nov 2014.
- [96] M. M. Denis *et al.*, "Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets," (in eng), *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 379-91, Aug 12 2005.
- [97] E. M. Golebiewska and A. W. Poole, "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond," (in eng), *Blood Rev*, vol. 29, no. 3, pp. 153-62, May 2015.
- [98] C. Heeschen *et al.*, "Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes," (in eng), *N Engl J Med*, vol. 348, no. 12, pp. 1104-11, Mar 20 2003.
- [99] S. Danese, C. de la Motte, B. M. Reyes, M. Sans, A. D. Levine, and C. Focchi, "Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification," *J Immunol*, vol. 172, no. 4, pp. 2011-5, Feb 15 2004.
- [100] R. E. Marques, R. Guabiraba, R. C. Russo, and M. M. Teixeira, "Targeting CCL5 in inflammation," (in eng), *Expert Opin Ther Targets*, vol. 17, no. 12, pp. 1439-60, Dec 2013.
- [101] M. H. Klinger, D. Wilhelm, S. Bubel, M. Sticherling, J. M. Schroder, and W. Kuhnel, "Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage," (in eng), *Int Arch Allergy Immunol*, vol. 107, no. 4, pp. 541-6, Aug 1995.
- [102] K. E. Driscoll, "Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation," (in eng), *Exp Lung Res*, vol. 20, no. 6, pp. 473-90, Nov-Dec 1994.
- [103] C. Page and S. Pitchford, "Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation," (in eng), *Int Immunopharmacol*, vol. 17, no. 4, pp. 1176-84, Dec 2013.

- [104] C. N. Jenne *et al.*, "Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps," (in eng), *Cell Host Microbe*, vol. 13, no. 2, pp. 169-80, Feb 13 2013.
- [105] B. McDonald, R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne, and P. Kubes, "Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis," (in eng), *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 3, pp. 324-33, Sep 13 2012.
- [106] J. M. van Gils, J. J. Zwaginga, and P. L. Hordijk, "Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 85, no. 2, pp. 195-204, Feb 2009.
- [107] B. D. Elzey *et al.*, "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 9-19, Jul 2003.
- [108] E. Boilard *et al.*, "Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production," (in eng), *Science*, vol. 327, no. 5965, pp. 580-3, Jan 29 2010.
- [109] D. L. Sprague, B. D. Elzey, S. A. Crist, T. J. Waldschmidt, R. J. Jensen, and T. L. Ratliff, "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles," *Blood*, vol. 111, no. 10, pp. 5028-36, May 15 2008.
- [110] C. van Kooten and J. Banchereau, "CD40-CD40 ligand," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 67, no. 1, pp. 2-17, Jan 2000.
- [111] V. Henn, S. Steinbach, K. Buchner, P. Presek, and R. A. Kroczeck, "The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40," (in eng), *Blood*, vol. 98, no. 4, pp. 1047-54, Aug 15 2001.
- [112] A. Khandoga, M. Hanschen, J. S. Kessler, and F. Krombach, "CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets," *Hepatology*, vol. 43, no. 2, pp. 306-15, Feb 2006.
- [113] S. F. de Stoppelaar, C. van 't Veer, and T. van der Poll, "The role of platelets in sepsis," *Thromb Haemost*, vol. 112, no. 2, Jun 26 2014.
- [114] H. Ogura *et al.*, "Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis," (in eng), *J Trauma*, vol. 50, no. 5, pp. 801-9, May 2001.
- [115] R. C. Jacoby, J. T. Owings, J. Holmes, F. D. Battistella, R. C. Gosselin, and T. G. Paglieroni, "Platelet activation and function after trauma," (in eng), *J Trauma*, vol. 51, no. 4, pp. 639-47, Oct 2001.
- [116] M. E. Kutcher *et al.*, "Characterization of platelet dysfunction after trauma," *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 73, no. 1, pp. 13-9, Jul 2012.
- [117] C. Solomon *et al.*, "Platelet function following trauma. A multiple electrode aggregometry study," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 106, no. 2, pp. 322-30, Aug 2011.
- [118] S. Akca, P. Haji-Michael, A. de Mendonca, P. Suter, M. Levi, and J. L. Vincent, "Time course of platelet counts in critically ill patients," (in eng), *Crit Care Med*, vol. 30, no. 4, pp. 753-6, Apr 2002.
- [119] D. Moreau *et al.*, "Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays," (in eng), *Chest*, vol. 131, no. 6, pp. 1735-41, Jun 2007.
- [120] R. P. Baughman, E. E. Lower, H. C. Flessa, and D. J. Tollerud, "Thrombocytopenia in the intensive care unit," (in eng), *Chest*, vol. 104, no. 4, pp. 1243-7, Oct 1993.
- [121] T. H. Lundahl, J. Petersson, I. H. Fagerberg, S. Berg, and T. L. Lindahl, "Impaired platelet function correlates with multi-organ dysfunction. A study of patients with sepsis," (in eng), *Platelets*, vol. 9, no. 3-4, pp. 223-5, 1998.
- [122] M. Adamzik, K. Grolinger, J. Peters, and M. Hartmann, "Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis," (in eng), *Crit Care*, vol. 16, no. 5, p. R204, Oct 22 2012.
- [123] H. Lier, H. Krep, and H. Schochl, "[Coagulation management in the treatment of multiple trauma]," (in ger), *Anaesthesist*, vol. 58, no. 10, pp. 1010-26, Oct 2009. Gerinnungsmanagement bei der Polytraumaversorgung.

- [124] K. Balvers, M. R. Wirtz, S. van Dieren, J. C. Goslings, and N. P. Juffermans, "Risk factors for trauma-induced coagulopathy- and transfusion-associated multiple organ failure in severely injured trauma patients," (in eng), *Front Med (Lausanne)*, vol. 2, p. 24, 2015.
- [125] M. Maegele *et al.*, "Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients," (in eng), *Injury*, vol. 38, no. 3, pp. 298-304, Mar 2007.
- [126] M. Burggraf, A. Payas, M. D. Kauther, C. Schoeneberg, and S. Lendemans, "Evaluation of clotting factor activities early after severe multiple trauma and their correlation with coagulation tests and clinical data," (in eng), *World J Emerg Surg*, vol. 10, p. 43, 2015.
- [127] A. Cap and B. J. Hunt, "The pathogenesis of traumatic coagulopathy," (in eng), *Anaesthesia*, vol. 70 Suppl 1, pp. 96-101, e32-4, Jan 2015.
- [128] K. Brohi, M. J. Cohen, M. T. Ganter, M. A. Matthay, R. C. Mackerse, and J. F. Pittet, "Acute traumatic coagulopathy: initiated by hypoperfusion: modulated through the protein C pathway?," (in eng), *Ann Surg*, vol. 245, no. 5, pp. 812-8, May 2007.
- [129] J. L. Kashuk *et al.*, "Primary fibrinolysis is integral in the pathogenesis of the acute coagulopathy of trauma," (in eng), *Ann Surg*, vol. 252, no. 3, pp. 434-42; discussion 443-4, Sep 2010.
- [130] A. Levrat *et al.*, "Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients," (in eng), *Br J Anaesth*, vol. 100, no. 6, pp. 792-7, Jun 2008.
- [131] T. Haas, D. Fries, K. A. Tanaka, L. Asmis, N. S. Curry, and H. Schochl, "Usefulness of standard plasma coagulation tests in the management of perioperative coagulopathic bleeding: is there any evidence?," (in eng), *Br J Anaesth*, vol. 114, no. 2, pp. 217-24, Feb 2015.
- [132] H. Lier, B. W. Bottiger, J. Hinkelbein, H. Krep, and M. Bernhard, "Coagulation management in multiple trauma: a systematic review," *Intensive Care Med*, vol. 37, no. 4, pp. 572-82, Apr 2011.
- [133] K. Abdelfattah and M. W. Cripps, "Thromboelastography and Rotational Thromboelastometry use in trauma," *Int J Surg*, vol. 33, no. Pt B, pp. 196-201, Sep 2016.
- [134] C. Solomon, H. Schochl, M. Ranucci, and C. J. Schlimp, "Can the Viscoelastic Parameter alpha-Angle Distinguish Fibrinogen from Platelet Deficiency and Guide Fibrinogen Supplementation?," (in eng), *Anesth Analg*, vol. 121, no. 2, pp. 289-301, Aug 2015.
- [135] H. Schochl, C. J. Schlimp, and W. Voelckel, "[Perioperative coagulation management in multiple trauma patients based on viscoelastic test results]," *Unfallchirurg*, vol. 117, no. 2, pp. 111-7, Feb 2014. Gerinnungsmanagement bei Polytrauma mit Hilfe viskoelastischer Tests.
- [136] M. O. Li and A. Y. Rudensky, "T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function," *Nat Rev Immunol*, vol. 16, no. 4, pp. 220-33, Apr 2016.
- [137] C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, and D. G. Altman, "Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research," *J Pharmacol Pharmacother*, vol. 1, no. 2, pp. 94-9, Jul 2010.
- [138] M. Hanschen, G. Tajima, F. O'Leary, K. Ikeda, and J. A. Lederer, "Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells," *Shock*, vol. 35, no. 3, pp. 252-7, Mar 2011.
- [139] A. Kurec, "Flow cytometry: principles and practices," *MLO Med Lab Obs*, vol. 46, no. 5, pp. 28, 30-1, May 2014.
- [140] S. Thebault and J. Ochoa-Garay, "Characterization of TCR-induced phosphorylation of PKCtheta in primary murine lymphocytes," *Mol Immunol*, vol. 40, no. 13, pp. 931-42, Feb 2004.
- [141] N. Isakov and A. Altman, "PKC-theta-mediated signal delivery from the TCR/CD28 surface receptors," (in eng), *Front Immunol*, vol. 3, p. 273, 2012.
- [142] T. Mustelin and K. Tasken, "Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases," (in eng), *Biochem J*, vol. 371, no. Pt 1, pp. 15-27, Apr 01 2003.
- [143] M. Firan, S. Dhillon, P. Estess, and M. H. Siegelman, "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44," (in eng), *Blood*, vol. 107, no. 2, pp. 619-27, Jan 15 2006.

- [144] X. Chen and J. J. Oppenheim, "The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells," (in eng), *Immunology*, vol. 133, no. 4, pp. 426-33, Aug 2011.
- [145] E. M. Shevach and G. L. Stephens, "The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?," *Nat Rev Immunol*, vol. 6, no. 8, pp. 613-8, Aug 2006.
- [146] J. J. Grailer, M. Kodera, and D. A. Steeber, "L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation," (in eng), *J Dermatol Sci*, vol. 56, no. 3, pp. 141-7, Dec 2009.
- [147] R. Gonzalez-Amaro, J. R. Cortes, F. Sanchez-Madrid, and P. Martin, "Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?," (in eng), *Trends Mol Med*, vol. 19, no. 10, pp. 625-32, Oct 2013.
- [148] M. R. Mirlashari, A. Rynningen, H. M. Mikkelsen, and M. H. Fukami, "Differential secretion of blood platelet storage granules," *Platelets*, vol. 7, no. 5-6, pp. 313-20, 1996.
- [149] M. Jayachandran, G. J. Brunn, K. Karnicki, R. S. Miller, W. G. Owen, and V. M. Miller, "In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk," (in eng), *J Appl Physiol (1985)*, vol. 102, no. 1, pp. 429-33, Jan 2007.
- [150] K. Hamamoto, S. Ohga, S. Nomura, and K. Yasunaga, "Cellular distribution of CD63 antigen in platelets and in three megakaryocytic cell lines," (in eng), *Histochem J*, vol. 26, no. 4, pp. 367-75, Apr 1994.
- [151] G. Matarese, V. De Rosa, and A. La Cava, "Regulatory CD4 T cells: sensing the environment," *Trends Immunol*, vol. 29, no. 1, pp. 12-7, Jan 2008.
- [152] M. Hanschen, G. Tajima, F. O'Leary, K. Hoang, K. Ikeda, and J. A. Lederer, "Phospho-flow cytometry based analysis of differences in T cell receptor signaling between regulatory T cells and CD4+ T cells," *J Immunol Methods*, vol. 376, no. 1-2, pp. 1-12, Feb 28 2012.
- [153] C. B. Bergmann *et al.*, "Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model," *Immunol Res*, vol. 64, no. 2, pp. 508-17, Apr 2016.
- [154] H. Ait-Oufella, E. Maury, S. Lehoux, B. Guidet, and G. Offenstadt, "The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis," *Intensive Care Med*, vol. 36, no. 8, pp. 1286-98, Aug 2010.
- [155] W. J. Chen, X. F. Hu, M. Yan, W. Y. Zhang, X. B. Mao, and Y. W. Shu, "Human umbilical vein endothelial cells promote the inhibitory activation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells via PD-L1," *Atherosclerosis*, vol. 244, pp. 108-12, Jan 2016.
- [156] M. F. Osuchowski *et al.*, "Abandon the mouse research ship? Not just yet!," *Shock*, vol. 41, no. 6, pp. 463-75, Jun 2014.
- [157] L. Zhu, Z. Huang, R. Stalesen, G. K. Hansson, and N. Li, "Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4+ T-cell proliferation," *J Thromb Haemost*, vol. 12, no. 7, pp. 1156-65, Jul 2014.
- [158] F. Yue *et al.*, "A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome," *Nature*, vol. 515, no. 7527, pp. 355-64, Nov 20 2014.
- [159] Y. Vodovotz *et al.*, "In silico models of acute inflammation in animals," (in eng), *Shock*, vol. 26, no. 3, pp. 235-44, Sep 2006.
- [160] A. Abdullahi, S. Amini-Nik, and M. G. Jeschke, "Animal models in burn research," *Cell Mol Life Sci*, vol. 71, no. 17, pp. 3241-55, Sep 2014.
- [161] G. Andonegui, S. M. Kerfoot, K. McNagny, K. V. Ebbert, K. D. Patel, and P. Kubes, "Platelets express functional Toll-like receptor-4," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2417-23, Oct 1 2005.
- [162] R. S. Robins, C. A. Lemarie, S. Laurance, M. N. Aghourian, J. Wu, and M. D. Blostein, "Vascular Gas6 contributes to thrombogenesis and promotes tissue factor up-regulation after vessel injury in mice," *Blood*, vol. 121, no. 4, pp. 692-9, Jan 24 2013.
- [163] H. F. Langer *et al.*, "Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis," *Circ Res*, vol. 110, no. 9, pp. 1202-10, Apr 27 2012.

- [164] P. F. Forde *et al.*, "Enhancement of electroporation facilitated immunogene therapy via T-reg depletion," *Cancer Gene Ther*, vol. 21, no. 8, pp. 349-54, Aug 2014.
- [165] Y. Y. Setiady, J. A. Coccia, and P. U. Park, "In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes," *Eur J Immunol*, vol. 40, no. 3, pp. 780-6, Mar 2010.
- [166] J. Vent-Schmidt, J. M. Han, K. G. MacDonald, and M. K. Levings, "The role of FOXP3 in regulating immune responses," *Int Rev Immunol*, vol. 33, no. 2, pp. 110-28, Mar 2014.
- [167] K. Lahl and T. Sparwasser, "In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model," *Methods Mol Biol*, vol. 707, pp. 157-72, 2011.
- [168] C. T. Mayer *et al.*, "Advantages of Foxp3(+) regulatory T cell depletion using DEREK mice," *Immun Inflamm Dis*, vol. 2, no. 3, pp. 162-5, Nov 2014.
- [169] E. P. Tenorio, J. Fernandez, J. E. Olguin, and R. Saavedra, "Depletion with PC61 mAb before *Toxoplasma gondii* infection eliminates mainly Tregs in BALB/c mice, but activated cells in C57BL/6J mice," *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 62, no. 3, pp. 362-7, Aug 2011.
- [170] K. N. Couper *et al.*, "Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection," *J Immunol*, vol. 182, no. 7, pp. 3985-94, Apr 01 2009.
- [171] F. L. Liu, T. L. Chen, and R. M. Chen, "Mechanisms of ketamine-induced immunosuppression," (in eng), *Acta Anaesthesiol Taiwan*, vol. 50, no. 4, pp. 172-7, Dec 2012.
- [172] R. Gurfinkel *et al.*, "Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats," (in eng), *Anesth Analg*, vol. 103, no. 2, pp. 396-402, table of contents, Aug 2006.
- [173] A. M. Al-Mousawi *et al.*, "Impact of anesthesia, analgesia, and euthanasia technique on the inflammatory cytokine profile in a rodent model of severe burn injury," (in eng), *Shock*, vol. 34, no. 3, pp. 261-8, Sep 2010.
- [174] P. Dahiya, "Burns as a model of SIRS," *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 14, pp. 4962-7, 2009.
- [175] D. D. Stieritz and I. A. Holder, "Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description of a burned mouse model," *J Infect Dis*, vol. 131, no. 6, pp. 688-91, Jun 1975.
- [176] A. N. Hamood, J. A. Griswold, and C. M. Duhan, "Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections," *J Surg Res*, vol. 61, no. 2, pp. 425-32, Mar 1996.
- [177] V. Brezar, W. J. Tu, and N. Seddiki, "PKC-Theta in Regulatory and Effector T-cell Functions," *Front Immunol*, vol. 6, p. 530, 2015.
- [178] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich, "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators," (in eng), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 33-45, Jan 2003.
- [179] A. Bremser, M. Brack, and A. Izcue, "Higher Sensitivity of Foxp3+ Treg Compared to Foxp3-Conventional T Cells to TCR-Independent Signals for CD69 Induction," (in eng), *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0137393, 2015.
- [180] J. R. Cortes *et al.*, "Maintenance of immune tolerance by Foxp3+ regulatory T cells requires CD69 expression," (in eng), *J Autoimmun*, vol. 55, pp. 51-62, Dec 2014.
- [181] P. A. Taylor *et al.*, "L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection," (in eng), *Blood*, vol. 104, no. 12, pp. 3804-12, Dec 01 2004.
- [182] S. Fu *et al.*, "CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential," (in eng), *Am J Transplant*, vol. 4, no. 1, pp. 65-78, Jan 2004.
- [183] C. Lange, M. Scholl, A. Melms, and F. Bischof, "CD62L(high) Treg cells with superior immunosuppressive properties accumulate within the CNS during remissions of EAE," (in eng), *Brain Behav Immun*, vol. 25, no. 1, pp. 120-6, Jan 2011.

- [184] B. Kwon *et al.*, "Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 274, no. 10, pp. 6056-61, Mar 05 1999.
- [185] R. S. McHugh *et al.*, "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor," (in eng), *Immunity*, vol. 16, no. 2, pp. 311-23, Feb 2002.
- [186] A. Corthay, "How do regulatory T cells work?," *Scand J Immunol*, vol. 70, no. 4, pp. 326-36, Oct 2009.
- [187] R. Hamano, J. Huang, T. Yoshimura, J. J. Oppenheim, and X. Chen, "TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 41, no. 7, pp. 2010-20, Jul 2011.
- [188] M. Gunst, V. Ghaemmaghami, A. Gruszecki, J. Urban, H. Frankel, and S. Shafi, "Changing epidemiology of trauma deaths leads to a bimodal distribution," (in eng), *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, vol. 23, no. 4, pp. 349-54, Oct 2010.
- [189] D. D. Trunkey, "Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research," (in eng), *Sci Am*, vol. 249, no. 2, pp. 28-35, Aug 1983.
- [190] K. W. Lansink, A. C. Gunning, and L. P. Leenen, "Cause of death and time of death distribution of trauma patients in a Level I trauma centre in the Netherlands," *Eur J Trauma Emerg Surg*, vol. 39, no. 4, pp. 375-83, Aug 2013.
- [191] P. C. Armstrong and K. Peter, "GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again," (in eng), *Thromb Haemost*, vol. 107, no. 5, pp. 808-14, May 2012.
- [192] H. Heijnen and P. van der Sluijs, "Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?," *J Thromb Haemost*, vol. 13, no. 12, pp. 2141-51, Dec 2015.
- [193] K. Gorlinger, V. Bhardwaj, and P. M. Kapoor, "Simulation in coagulation testing using rotational thromboelastometry: A fast emerging, reliable point of care technique," (in eng), *Ann Card Anaesth*, vol. 19, no. 3, pp. 516-20, Jul-Sep 2016.
- [194] ROTEM®. (10. August 2018). *Cup & Pin mini, Zubehör für ROTEM® delta* Available: <https://www.rotem.de/produkte/rotem-delta/zubehoer/cup-pin-mini/>
- [195] R. A. Davenport *et al.*, "Activated Protein C Drives the Hyperfibrinolysis of Acute Traumatic Coagulopathy," *Anesthesiology*, vol. 126, no. 1, pp. 115-127, Jan 2017.
- [196] J. Pan *et al.*, "Enhanced efficacy of recombinant FVIII in noncovalent complex with PEGylated liposome in hemophilia A mice," *Blood*, vol. 114, no. 13, pp. 2802-11, Sep 24 2009.
- [197] V. M. Stoecklein, A. Osuka, and J. A. Lederer, "Trauma equals danger--damage control by the immune system," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 92, no. 3, pp. 539-51, Sep 2012.
- [198] F. Venet *et al.*, "Regulatory T cell populations in sepsis and trauma," *J Leukoc Biol*, vol. 83, no. 3, pp. 523-35, Mar 2008.
- [199] I. K. Gratz and D. J. Campbell, "Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance," (in eng), *Front Immunol*, vol. 5, p. 333, 2014.
- [200] S. Fujimi *et al.*, "Platelet depletion in mice increases mortality after thermal injury," *Blood*, vol. 107, no. 11, pp. 4399-406, Jun 1 2006.
- [201] K. Y. Stokes and D. N. Granger, "Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction," *J Physiol*, vol. 590, no. 5, pp. 1023-34, Mar 1 2012.
- [202] N. Ni Choileain, M. MacConmara, Y. Zang, T. J. Murphy, J. A. Mannick, and J. A. Lederer, "Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury," (in eng), *J Immunol*, vol. 176, no. 1, pp. 225-36, Jan 01 2006.
- [203] A. Yaguchi, F. L. Lobo, J. L. Vincent, and O. Pradier, "Platelet function in sepsis," *J Thromb Haemost*, vol. 2, no. 12, pp. 2096-102, Dec 2004.

- [204] R. M. Van Haren *et al.*, "Hypercoagulability after burn injury," (in eng), *J Trauma Acute Care Surg*, vol. 75, no. 1, pp. 37-43; discussion 43, Jul 2013.
- [205] C. E. Wade *et al.*, "Upon admission coagulation and platelet function in patients with thermal and electrical injuries," (in eng), *Burns*, vol. 42, no. 8, pp. 1704-1711, Dec 2016.
- [206] E. F. Midura *et al.*, "Impact of Platelets and Platelet-Derived Microparticles on Hypercoagulability Following Burn Injury," (in eng), *Shock*, vol. 45, no. 1, pp. 82-7, Jan 2016.

10 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich maßgeblich bei meiner Dissertation unterstützt haben:

An erster Stelle geht mein besonderer Dank geht an PD Dr. Marc Hanschen für seine stete Unterstützung, Motivation und Geduld. Ich verdanke ihm die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Durch ihn habe ich gelernt mittels strukturiertem und kritischem Hinterfragen von Methoden und Ergebnissen meine wissenschaftlichen Fähigkeiten auszubauen. Ich bin dankbar, dass er sich neben einem fordernden klinischen Alltag immer die Zeit genommen hat Ergebnisse zu diskutieren und stets mit Rat zur Seite stand.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Dr. van Griensven danken, da er sich im normalen Laboralltag stets die Zeit genommen hat um Zwischenstände der Arbeit zu diskutieren. Dies ermöglichte kontinuierlich eine kritische und zielführende Auseinandersetzung mit den Forschungsergebnissen.

Außerdem wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen ohne die gute Zusammenarbeit im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie. Mein Dank geht dabei besonders an Marina Unger und Fritz Seidl für Hilfe bei jedem technischen oder organisatorischen Problem. Neben den genannten geht mein Dank auch an das restliche Team der Experimentellen Unfallchirurgie.

Ich danke auch Frederike Hefe für die praktische Unterstützung bei einigen Experimenten.

11 Publikationsverzeichnis

Bock M, **Bergmann CB**, Jung S, Kalbitz M, Relja B, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., *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, 2018

Bergmann CB, Hefele F, Unger M, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M, Hanschen M., *Platelets modulate the immune response following trauma by interaction with CD4+ T regulatory cells in a mouse model.* Immunol Res., 64:508-517, 2016