

**Immunmodulierende Wirkung von
Hitze-Schock-Proteinen (HSP) nach Gewebeschaden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der

Universität Duisburg-Essen
vorgelegt von

Jörg-Martin Bangen
Geboren in Essen

April 2008

Die der folgenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Arbeitsgruppe Chirurgische Forschung, Klinik für Unfallchirurgie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. F.U. Schade
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp
3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Grümmer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 2009

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Flohé SB, Bangen JM, Flohé S, Agrawal H, Bergmann K, Schade FU.
Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins.
Shock. 2007 May;27(5):494-502

Bangen JM, Schade FU, Flohé SB.
Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation.
Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):709-15. Epub 2007 May 30.

Weitere Publikationen während der Promotion:

Flohé SB, Agrawal H, Flohé S, Rani M, Bangen JM, Schade FU.
Diversity of interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in restoring immune dysfunction of dendritic cells and macrophages during polymicrobial sepsis.
Mol Med. 2008 Feb 24; [Epub ahead of print]

Oberbeck R, Deckert H, Bangen J, Kobbe P, Schmitz D.
Dehydroepiandrosterone: a modulator of cellular immunity and heat shock protein 70 production during polymicrobial sepsis.
Intensive Care Med. 2007 Dec;33(12):2207-13. Epub 2007 Sep 26

Hoffmann D, Bangen JM, Bayer W, Wildner O.
Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer.
Gene Ther. 2006 Nov;13(21):1534-44. Epub 2006 Jun 22

Posterpräsentationen:

Bangen J.M., Bergmann K., Schade F.U., Schmitz D., Flohé S., and Flohé S.B.
Heat Shock Proteins as Mediators of Immunomodulation after Trauma?
Joint Annual Meeting of the German and Dutsch Societies for Immunology (Jami), 20-23 October 2004, Maastricht , The Netherlands

J. M. Bangen, F. U. Schade, S. Flohé, K. Bergmann and S. B. Flohé,
Origin of Immunomodulation after soft Tissue Trauma
12th Congress European Shock Society 14-16 September 2006, Ulm, Germany

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	10
1.2. SYSTEMISCHE WIRKUNG DES TRAUMAS	12
1.3. MECHANISMEN DER REGENERATION NACH GEWEBESCHADEN	14
1.4. HITZESCHOCKPROTEINE	16
1.5. ZIELE DER ARBEIT	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 MATERIALIEN	20
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.2 Zellkulturmedien.....	20
2.1.3 Zell-Linien	21
2.1.4 Antikörper, Lösungen und Puffer für durchflusszytometrische Analysen	21
2.1.5 Verbrauchsmaterial	21
2.1.6 Labor-Geräte	22
2.2 VERSUCHSTIERE	22
2.3 PATIENTEN	23
2.4 METHODEN	23
2.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Wundflüssigkeit	23
2.4.2 Gewinnung zellfreier Wundflüssigkeit	25
2.4.3 Stimulation der mononukleären Zellen in der Zellkultur.....	25
2.4.4.1 Nachweis von löslichen Zytokinen oder Chemokinen mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	25
2.4.4.2 Human IL-8, TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES, HSP70 ELISA.....	26
2.4.4.3 Maus KC, MCP-1, MIP1 α TNF- α ELISA.....	27
2.4.5 Durchflusszytometrie und Fluorescence Associated Cell analyses	27
2.4.6 Färbung von Zelloberflächenmolekülen.....	29
2.4.8 Proteinverdau mit Agarose-gekoppelter Proteinase K.....	32
2.4.9 Gesamtprotein-Bestimmung	32
2.4.10 Immunpräzipitation.....	33
2.4.11 SDS-Page.....	34
2.4.12 Western Blot	35
2.4.13 Detektion.....	36
2.4.14 Trauma-Modell bei der Maus.....	37
2.4.15 Isolation von Muskelzellen aus der Maus.....	38
2.4.16 Konfokale Laserscannmikroskopie.....	38
2.4.17 Immunfluoreszenz für LSM.....	40
2.4.18 Polymerase Kettenreaktion.....	42
3. ERGEBNISSE.....	45
3.1 DIE AUSWIRKUNG EINES WEICHTEILTRAUMAS AUF DAS IMMUNSYSTEM.....	45
3.1.1 Stimulierbarkeit der Zellen aus Wundflüssigkeit und peripherem Blut	45
3.1.2 Inhibitorische Wirkung der Wundflüssigkeit	47
3.1.3. Veränderung der Zellzusammensetzung in der Wundflüssigkeit im Vergleich zum Blut	49
3.1.4 Induktion der Chemokin-Produktion durch Wundflüssigkeit.....	50
3.1.5 Der stimulierende Faktor in der Wundflüssigkeit ist ein Protein	51
3.1.6 Die Wundflüssigkeit enthält intrazelluläre Bestandteile von Muskelzellen	52
3.1.6 Kontrolle der Wundflüssigkeit und der erhöhten Proteinwerte	55
3.2.1 DIE IMMUNMODULIERENDE WIRKUNG EINIGER PROTEINE IN DER WUNDFLÜSSIGKEIT	56
3.2.2 Die Wirkung des HSP ist durch Proteinase K aufhebbar.....	58
3.2.3 Der modulierende Faktor verändert die Zellen und ist löslich im Überstand vorhanden	59
3.2.4 Modulation der LPS-induzierten TNF- α Synthese durch HSP	61
3.2.5 Immunmodulation durch HSP	62
3.2.6 Ausschluss von Kontamination des rekombinanten HSP als Ursache für die modulatorische Wirkung	63
3.2.7 Das Bindungsverhalten von LPS wird durch HSP nicht verändert	65
3.2.8 HSP70 erhöht die TLR4 Expression auf Monozyten.....	66

3.3.1 WIRKUNG EINES DEFINIERTEN WEICHTEILTRAUMAS IN DER MAUS	68
3.3.2 Freisetzung von HSP60 aus dem traumatisierten Muskel	69
3.3.3 LSM Aufnahmen der Muskeln.....	69
3.3.4 Zellinfiltration in den geschädigten Muskel	71
3.3.5 Untersuchung der m-RNA in den Muskeln	74
3.3.6 Chemokinsynthese in Muskelzellen.....	77
4. DISKUSSION	80
4.1 VERÄNDERUNG DER IMMUNANTWORT DURCH DAS WEICHTEILTRAUMA	80
4.2. DER IMMUNMODULIERENDE FAKTOR STAMMT AUS DEN ZELLEN SELBST	82
4.3.1 MECHANISMEN DER MODULATION DURCH HSP	85
4.3.2 Die Verwendung rekombinanter Proteine	86
4.4 DEFINIERTES WEICHTEILTRAUMA IN DER MAUS.....	89
4.5 CHEMOKINPRODUKTION IM TRAUMATISIERTEN MUSKEL	90
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6 LITERATURVERZEICHNIS	95

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CK	Creatin Kinase
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
Cy	Cyanin
Cy7/Cy5.5	Cyaninfarbstoffe
d.h.	das heißt
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic cell(s)-Dendritische Zellen
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E.coli	Escheria coli.
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
et al	et alia
ETOH	Ethanol
EU/ml	Endotoxin Units pro Milliliter
FAB	Antigenbindende Fragmente
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCM	Flow Cytometry
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluorochrome
FSC	Forward-Scattered Light

G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP96	Glycoprotein-96
GR-1	Granulozyten Antikörper 1
Gran	Granulozyten
Hb	Hämoglobin
HE Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen Heterodimere
HMGB 1	High Mobility Group Box 1
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase
HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
HSP	Heat Shock Proteins, Hitze-Schock-Proteine
HSP70TG	HSP70 transgen
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischemie-Reperfusion
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon α
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
k-HSP	kontaminiertes HSP
LAL	Limulus Amoebocyte Assay
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser-Scan-Mikroskopischen
m. gastrocnemius	Wadenmuskel
mA	Milli Ampere
MAC	Makrophagen
MACS	Magnetic Associated Cell Sorting
MARS	Mixed Antagonist Response Syndrome
MCP-1	Macrophage-Chemoattractant-Protein 1
MD-2	Lymphocyte Antigen 96
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min.	Minute
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein 1
mM	Milli Molar
mm ³	Kubikmillimeter
MNC	MonoNukleäre Zellen

MODS	Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom
MOF	Multi Organ Failure
MOV	Multi Organ Versagen
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Myo	Myoglobin
N	Normal
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	Nuclear Faktor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NO	Nitrit Oxide
NP-40	Nonidet P-40
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PB	Peripheres Blut
PBMNC	Peripheral Blood Mono Nuclear Cell
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PerCPCy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein konjugiert mit Cy5.5
PFN	Proximaler Femur Nagel
PMT	Photomultiplier Tube
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
rek.	Rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rounds Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.c.	SubCutan
SAV	Streptavidin
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDF-1	Stroma-Derived Factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Side-scattered Light
Std.	Stunden
STIR	Short Tau Inversion Recovery
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus Aquaticus
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TC	TrueCount
TEP	Totale-Endo-Prothese
TGF	Transforming Growth-Factor

Abkürzungsverzeichnis

TLR	Toll-like receptor
TM	Annealing-Temperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan Monolaurat
U/ml	Units pro Milliliter
USA	United States of America
VLE	Very Low Endotoxin
Vol/Vol	Volumenspezifisch
W/Vol	Gewicht pro Volumen
WF	Wundflüssigkeit
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZTL	Zentrales Tier-Laboratorium

1. Einleitung

1.1 Das Trauma im Überblick

Epidemiologische Untersuchungen zeigen uns, dass in westlichen Ländern Traumata und ihre Folgen den dritten Platz in der Rangliste für Todesursachen einnehmen. Bei den unter 45-jährigen ist der Unfall mit seinen Folgen sogar die Haupttodesursache [1]. In Deutschland verunfallen jährlich ca. fünf Millionen Menschen, wovon 25.000 ihren Verletzungen erliegen [2]. Betrachtet man die auf Kriegsschauplätzen gesammelten Erfahrungen, so ergibt sich eine Veränderung der Todesursachen über die Zeit. Im ersten Weltkrieg verstarben die meisten Verwundeten noch an nicht substituierten Blutverlusten und im zweiten Weltkrieg, nach der Einführung von Bluttransfusionen, am posttraumatischen Nierenversagen, welches dann im Koreakrieg durch eine adäquate Therapie in den Griff zu bekommen war. Vor 50 Jahren war der akute hämorrhagische Schock die Ursache für über 90 % aller Todesfälle nach einem Unfall. Später, im Vietnamkrieg, trat die posttraumatische Lungeninsuffizienz (Adult Respiratory Distress Syndrome, ARDS) in den Vordergrund. Auch hierfür konnten Therapieschemata etabliert werden und so stellt heute das Multiorganversagen (seit 1992 Multi-Organ-Dysfunktions-Syndrom, MODS) die wichtigste und komplexeste Spätkomplikation mit hoher Letalität nach schweren Verletzungen dar [3, 4]. Ein Großteil der schwerverletzten Patienten verstirbt demnach nicht am initialen Trauma, sondern an den später auftretenden Komplikationen.

Da es sich bei ca. 70 % der tödlichen Traumata laut statistischem Bundesamt um Verkehrsunfälle handelt, liegt der Fokus der meisten Arbeiten auf dem Poly- oder Multiplem Trauma [5]. Die Behandlung dieser Schwerstverletzten ergibt in den Kliniken einige Probleme aufgrund des komplexen Verletzungsmusters [6-8]. Dabei ergibt sich vor allem das Problem, diese unterschiedlichen Verletzungsmuster wie Schädel-Hirn-Trauma, Thorax-Trauma, Frakturen, Weichteiltrauma und hämorrhagischer Schock zu klassifizieren. Trotz der Einführung von Punktesystemen zur Bewertung der Traumaschwere, ist es bis heute nicht möglich eine individuelle Prognose zu erstellen [9].

Der gemeinsame Nenner sekundärer Komplikationen nach Trauma wird in einem erworbenen Immundefektsyndrom gesehen, das letztlich als Ursache der posttraumatischen Sepsis und des posttraumatischen Organ-/Multiorganversagens gilt. Dabei ergibt sich folgende pathophysiologische Kausalkette [10]:

1. Trauma / mechanische Zerstörung von Weichteilgeweben, hämorrhagisch-traumatischer Schock, Ischämie / Reperfusionssyndrom.
2. Hypermetabolische Phase mit akuter (abakterieller) Entzündungsreaktion / inflammatorische Akutphasenreaktion („acute inflammatory response“), initial lokalisiert, später mit systemischer Ausbreitung.
3. Erworbener posttraumatischer Immundefekt.
4. Beginnende Manifestation des posttraumatischen Immundefektes („solid organ metabolic response“) mit Übergang zum Mono-Organversagen.
5. Septisches Multiorganversagen - Tod.

Faist und Mitarbeiter zeigten, dass die Mortalität der polytraumatisierten Patienten in engem Zusammenhang mit der Zahl der versagenden Organe steht [11]. Diese vor einigen Jahrzehnten noch unbekannt Phänomene sind also die Ursachen für den „late hospital death“, den so genannten zweiten Mortalitätsgipfel nach Trauma [12]. Dabei ist die Mortalität bei Patienten mit initial hypovolämischem Schock und nach Massentransfusionen signifikant erhöht. Septisch-toxisches Multiorganversagen erreicht, abhängig wiederum von der Zahl der betroffenen Organe, eine Letalität von 30 % bis 100 %. Das ARDS tritt dabei meist als erste Form eines Organversagens auf, gefolgt von Leberversagen, gastrointestinaler Dysfunktion, Nierenversagen und kardialer Dysfunktion [13]. Posttraumatisch werden dabei häufig eine verminderte Reaktivität der T-Lymphozyten und eine Suppression der Funktion der neutrophilen Granulozyten beobachtet [14, 15]. Der Zusammenhang zwischen schwerem Polytrauma und dem posttraumatischen Immundefektsyndrom stellte sich in einer Studie so dar, dass die Entwicklung einer Infektion bei 67 % der untersuchten Patienten in 26 % der Fälle zu Sepsis und in 11 % zum Tod führte. [16]. Regel und Tscherne [17] ziehen aus einer prospektiven Studie an 38 polytraumatisierten Patienten folgende Schlussfolgerungen: MOF (Multi-Organ-Failure) ist die schwerste Komplikation nach multiplem Trauma und endet häufig letal. Dabei ist der Mechanismus selbst unklar, allerdings wird ein generalisiertes Entzündungssyndrom diskutiert. Es treten selbst bei nicht durch das initiale Trauma geschädigten Organen Schäden auf, die sich ab dem vierten Tag manifestieren. Die Freisetzung toxischer Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies, Tumornekrosefaktor-alpha (Tumor Necrosis Factor alpha TNF- α) oder Endotoxin können dabei zu entzündlichen Veränderungen in allen Geweben führen und das Gewebe soweit schädigen, dass es zum Funktionsverlust führt. Durch nachfolgende Schäden des Kapillarendothels aller Organe tragen sie zur Entstehung eines irreversiblen und letalen MODS bei. Es wird postuliert, dass vor allem Verletzungsart und -schwere sowie die Höhe des initialen Blutverlustes als kritische

Faktoren angesehen werden können. Einmal klinisch manifestiert, erweist sich das MODS häufig als therapieresistent und bedingt eine hohe Letalität [18]. Die generalisierte Immunantwort auf ein traumatisches Geschehen kann überschießen und entspricht einem von Paul Ehrlich und J. Morgenroth 1901 in ihrer Schrift "Über Hämolytins" bezüglich der zerstörerischen Auswirkungen autoimmuner Prozesse beschriebenen Phänomen "...dass man gewissermaßen berechtigt wäre, von einem horror autotoxicus des Organismus zu sprechen" [19]. Dabei sind die Effekte eines Polytraumas so weitreichend und durch unterschiedliche Verletzungsarten geprägt, dass eine Betrachtung der einzelnen Komponenten sinnvoller erscheint.

1.2. Systemische Wirkung des Traumas

Es wird von einem hohen Prozentsatz an Traumapatienten berichtet, die nach Trauma an Sepsis versterben. So werden bis zu 78 % aller nicht neurologischen Todesfälle nach Trauma auf Sepsis (Invasion von Erregern und ihrer Toxine in die Blutbahn und einhergehendes Immunversagen) zurückgeführt [1]. Nach großen Operationen oder initialem Trauma wird eine überschießende Immunantwort des Organismus (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) beobachtet, die als wichtige Ursache des MODS angesehen wird [20]. Der Pathomechanismus dieses frühpostoperativen SIRS ist nicht bekannt. Es kommt dabei zu einer deutlichen Änderung in der Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems [21] und kann bis zum Organversagen führen. In einer groß angelegten Studie mit über 3000 Patienten wurde gezeigt, dass 68 % mindestens zwei Kriterien eines SIRS erfüllten und 48 % von ihnen eine Sepsis entwickelten [22]. Ein schweres Trauma induziert ein SIRS, das bei manchen Patienten persistiert. Dabei gelten mindestens zwei der folgenden Bedingungen als Anzeichen für SIRS [23, 24]: Fieber ($> 38\text{ °C}$), erhöhte Pulsfrequenz (> 90 Herzschläge/Min.), erhöhte Atemfrequenz (> 20 Atemzüge/Min.), Anstieg oder Abfall der Blutleukozyten (> 12000 Leukozyten/ mm^3 oder < 4000 Leukozyten/ mm^3). Bei gleichzeitigem Nachweis eines Erregers wird der Krankheitszustand Sepsis genannt. Da beim SIRS keine bakteriellen Bestandteile nachweisbar sind und zum Zeitpunkt des Traumas keine Entzündung vorliegt, wird von einer „sterilen Entzündung“ gesprochen, welche durch endogene Faktoren ausgelöst werden muss. Mit SIRS ist die Freisetzung pro-inflammatorischer Faktoren wie Interleukin (IL)-6, IL-8, IL-12 und IL-18 [25, 26] assoziiert. Dadurch kann es zu einem Immunstatus kommen, der nicht länger vom Körper kontrolliert werden kann [23]. Der Mechanismus, der zum SIRS führt, bleibt aber weiterhin ungeklärt. Zuerst wurde daher ein

Zusammenhang zwischen bakterieller Infektion mit SIRS und darauf folgender Sepsis angenommen. Die so genannte "Darm-Sepsis-Hypothese" geht davon aus, dass der Zusammenbruch der intestinalen Barriere mit bakterieller Translokation ein wesentlicher Schritt zur Entwicklung des SIRS ist. Die Reaktion des SIRS ähnelt den Effekten im Tiermodell bei hämorrhagischem Schock, Verbrennungen, Zirrhose und Pankreatitis. Bei diesen ist eine Freisetzung von bakteriellen Bestandteilen nachgewiesen und zeigt einen ähnlichen Verlauf zum SIRS [27]. Allerdings konnte für Traumpatienten eine Freisetzung von bakteriellen Bestandteilen nicht nachgewiesen werden [28].

Die Mehrheit der Patienten überstehen SIRS, ohne dass ein MultiOrganVersagen (MOV) auftritt. Parallel zum SIRS kommt es meist zu einer Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-4. Diese gegenregulatorische Reaktion wird auch als Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome (CARS) bezeichnet. Die Balance zwischen SIRS und CARS ist entscheidend für den Immunstatus des Patienten und damit für sein klinisches Schicksal.

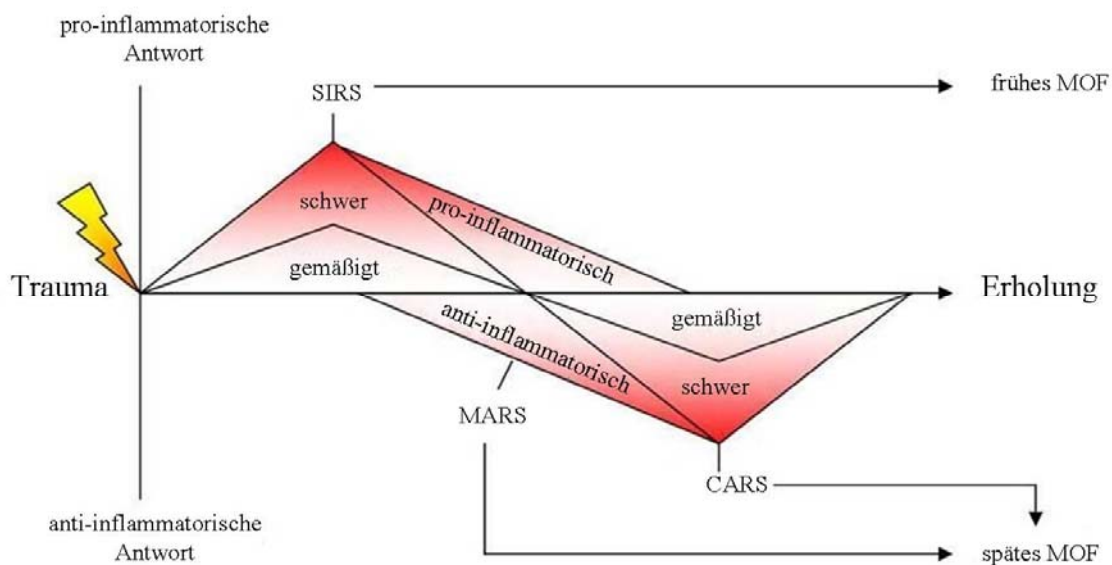


Abb. 1-1 Biphasisches Modell für ein MOF (Multi Organ Failure). Darstellung des ursprünglich von Moore [29] postulierten Modells für die Entwicklung eines Multiorganversagens. Die y-Achse zeigt die relative Immunantwort, während auf der x-Achse ein relativer Zeitverlauf nach Trauma dargestellt ist. Dabei kann es in einer frühen Phase zu einem pro-inflammatorischen Syndrom (SIRS) mit anschließendem Multiorganversagen kommen. In einem späteren Stadium, der Kompensation, kann es durch das CARS oder eine Mischung beider, dem MARS (Mixed Antagonist Response Syndrome), zu einem späten Multiorganversagen kommen [30].

Bei der Gegenregulation durch CARS kommt es zu einer verminderten Resistenz gegenüber Infektionen [31] und es kann damit zur nosokomialen Infektion mit anschließendem

Organversagen des Patienten führen [32]. Die verringerte Fähigkeit der Patienten zur Infektabwehr erhöht bei folgender Infektion und nicht funktionstüchtigem Immunsystem auch im CARS die Wahrscheinlichkeit zu Sepsis oder septischem Schock mit MOV und Tod [29]. Das CARS genannte anti-inflammatorische Syndrom wird häufig auch als Immunparalyse bezeichnet [33]. Diese Immunparalyse zeigt sich in der verringerten Fähigkeit der Immunzellen, Antigene zu präsentieren, [34] und die stark verringerte Reaktion aufgereinigter Monozyten auf Endotoxin [35]. Charakteristisch für CARS ist demnach eine Dysfunktion der T-Zellen und Monozyten. Bei der Untersuchung von Gesamtblutkulturen und isolierten Monozyten traumatisierter Patienten zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Immunsuppression und der Schwere des Traumas [36]. Dieses könnte ein Hinweis auf den Grund der Infektionsanfälligkeit von Traumapatienten und Schwerverletzten während CARS sein [33, 37]. Das angeborene Immunsystem ist während des CARS gehemmt: Monozyten zeigen eine reduzierte Humane-Leukozyten-Antigen-Heterodimer (HLA-DR) Expression [38], eine verringerte Antigenpräsentation und reagieren mit deutlich verringerter TNF- α Ausschüttung auf Endotoxin Stimulation *ex vivo* [39]. Es zeigen sich dabei Ähnlichkeiten zur Monozyten-Dysfunktion bei Sepsis [35]. Die Ursache für diese gravierende Änderung des angeborenen Immunsystems ist nicht bekannt. Es werden sowohl Zellen wie regulatorische T-Zellen oder myeloide Supressorzellen, als auch lösliche Faktoren, die durch das Trauma freigesetzt wurden und Kulturen von Vergleichsblut beeinflussen können, diskutiert [36, 40]. Da ein mechanisches Trauma zwangsläufig zu Nekrose führt, könnten intrazelluläre Bestandteile als so genannte *Danger Signals* freigesetzt werden. Dabei findet die Familie der Hitze-Schock-Proteine (Heat Shock Proteins, HSP) immer größere Bedeutung. Als mögliche Kandidaten kamen die HSP Ubiquitin und auch HSP60 und HSP70 in Frage, welche im Serum von Traumapatienten gefunden wurden [41-43]. Ubiquitin hemmt die Freisetzung von TNF- α nach Endotoxin-Stimulation von humanen Monozyten und könnte daher in der Entwicklung einer Immunsuppression nach Trauma eine Rolle spielen [43]. Eine Annahme ist demnach, dass endogene Faktoren zur Entzündung in Abwesenheit von Mikroorganismen führen und damit sowohl SIRS als auch CARS ausgelöst werden können.

1.3. Mechanismen der Regeneration nach Gewebeschaden

Studien über Muskelschädigung zeigten, dass z.B. durch Überbelastung [44] oder durch hämorrhagischen Schock [45] die beginnende Wundheilung mit einer Infiltration von

Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen assoziiert ist [46, 47]. Dabei sind als erstes eine schnelle Freisetzung von Granulozyten aus dem Knochenmark in den systemischen Kreislauf und deren Infiltration in das geschädigte Gewebe zu beobachten [46, 48]. Die Neutrophilen stellen eine wichtige erste Reaktion auf eine Verletzung dar. Sie wandern sehr schnell ein und stellen die erste natürliche Abwehr gegen Mikroorganismen dar. Im Anschluss werden Monozyten und Makrophagen rekrutiert und starten die Wundheilung [49]. Sie entfernen Zelltrümmer und sezernieren sowohl Chemokine als auch Wachstumsfaktoren, wie den Transforming Growth Faktor (TGF) β [50]. Die in das geschädigte Gewebe einwandernden Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen und haben einen deutlichen Einfluss auf die späteren Phasen der Proliferation und Differenzierung des Gewebes [51, 52]. Sie erreichen das geschädigte Gewebe in großer Zahl, angezogen durch einen chemotaktischen Gradienten. Dort phagozytieren sie unter anderem Mikroorganismen und präsentieren Antigene über den Major-Histocompatibility-Complex II (MHC-II) Rezeptor an T-Lymphozyten. In verletzten Patienten bilden sie so die Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [30, 53]. Im murinen System konnte außerdem gezeigt werden, dass Monozyten nicht nur befähigt sind, in Makrophagen zu differenzieren, sondern auch in inflammatorische dendritische Zellen, welche TNF- α und induzierbares Stickstoffoxid produzieren können [54]. Die Funktion von einwandernden dendritischen Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen, die auch in peripherem, nicht lymphatischem Gewebe gefunden werden. Nach Antigen-Aufnahme wandern die dendritischen Zellen in die drainierenden Lymphknoten und induzieren eine spezifische T-Zell-Antwort [55]. Zusätzlich spielen die dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle in der Induktion von Toleranz auf körpereigene Antigene [56]. Die Annahme, dass dendritische Zellen bei Wundheilung das Immunsystem modulieren, konnte bei mechanischem Muskeltrauma noch nicht nachgewiesen werden. Eine Studie zeigte allerdings die Einwanderung und Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen nach intramuskulärer DNA-Vakzinierung [57].

Die Infiltration von Zellen in das Gewebe wird durch Chemokine vermittelt, wie sie zum Beispiel bei Entzündungen freigesetzt werden. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, also kleine Signalproteine, die bei ihren Zielzellen eine Wanderungsbewegung auslösen (Chemotaxis). Die Zielzellen bewegen sich dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Migration von Immunzellen im Gewebe und bei deren Auswanderung aus dem Blut. Manche Chemokine wirken zusätzlich aktivierend auf

Immunzellen [58]. Repräsentative Chemokine sind IL-8, welches Granulozyten anzieht, MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein 1), welches Makrophagen und dendritische Zellen anzieht, und MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1), das sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen anlockt [57]. SDF-1 (Stroma-Derived Faktor 1) induziert die Migration von Lymphozyten und dendritischen Zellen. Ein weiterer Faktor ist RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), welcher sowohl Granulozyten und Monozyten als auch Lymphozyten anziehen kann [59, 60]. Dabei ist vor allem IL-8 ein Schlüsselchemokin, welches Leukozyten anziehen und dadurch die Wundheilung im Gewebe induzieren kann [61]. Wie die Freisetzung von Chemokinen durch Weichteilschaden ausgelöst wird, ist allerdings bisher unklar. Sowohl SDF-1 als auch MCP-1 werden im Muskel exprimiert und könnten eine Infiltration von Zellen aufgrund von Trauma vermitteln [62, 63]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die mRNA von mehreren Chemokinen wie Macrophage Inflammatory Protein 1 α und β (MIP-1 α/β) und MCP-1 im Mausmuskel nach Gewebeschaden durch Kälte höher exprimiert werden. Werden diese Chemokine durch neutralisierende Antikörper ausgeschaltet, kommt es im murinen System zu einer verzögerten Wundheilung. SDF-1 konnte in Muskelstammzellen gefunden werden und diese Zellen lassen sich auch mit diesem Protein stimulieren [64].

1.4. Hitzeschockproteine

HSP sind hochkonservierte Moleküle, die als Chaperone die korrekte Faltung von neu gebildeten Proteinen in der Zelle kontrollieren. Sie kommen dabei in unterschiedlichen Bereichen der Zelle, wie dem Zytoplasma, in den Mitochondrien oder im Endoplasmatischen Retikulum vor. Die Familie der HSP wird in Gruppen aufgrund ihrer Masse unterteilt: kleine HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100. Die Synthese der HSP wird durch verschiedene Stressfaktoren wie Hypoxie, Schwermetalle, Glukose-Mangel, Strahlung oder Scherkräfte ausgelöst, wobei sie auch, wahrscheinlich aufgrund ihrer Chaperon-Aktivität, vor diesen Schäden schützen [65-67]. Die zwei am besten untersuchten HSP sind HSP60 und HSP70. HSP70 ist dabei die am besten untersuchte Form, da sie durch unterschiedliche Stressarten induziert werden kann, während das im Endoplasmatischen Retikulum vorkommende HSP60 konstitutiv exprimiert ist und schwächer reguliert wird [68, 69].

HSP70 ist zusätzlich in der Lage pro-inflammatorische Reaktionen über den Nuclear Faktor (NF)- κ B zu blockieren [70, 71]. Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS)

und Stickoxid (Nitric Oxide, NO), die bei der Ischämie-Reperfusion (I/R) entstehen, induzieren die Synthese von HSP [72-75]. Dabei ist HSP60 in der Lage, den apoptotischen Zelltod nach Ischämie-Reoxygenierung *in vitro* zu verhindern [76]. Durch die Induktion von HSP *in vivo*, z.B. durch Hitzestress, entsteht eine protektive Wirkung gegen Endotoxin-Schock [77] und die Schädigung durch I/R [78, 79]. Ebenso schützt die Überexpression von HSP70 in Ratten vor Myokard-Schäden nach I/R [80]. Es scheint dabei ein ähnlicher Mechanismus vorzuliegen wie bei der Toleranz gegen I/R durch vorkonditionierte Ischämie [81-84]. Treten HSP hingegen extrazellulär auf, werden sie zur Gruppe der so genannten „Alarmino“ gezählt, welche bei der Entzündung nach Gewebeschaden auftreten [85]. Erstmals wurden die „Alarmino“ im sogenannten „Danger model“ als endogene Alarmsignale beschrieben, welche durch verletztes oder gestresstes Gewebe freigesetzt werden [86]. Durch ihre Eigenschaften wurden die endogenen Alarmsignale zur Familie der Damage Associated Molecular Patterns (DAMP) zugeordnet [85]. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind neben den HSP, Harnsäure, extrazelluläres Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) und High Mobility Group Box 1 (HMGB 1). Einige dieser Alarmsignale wie HMGB 1 werden nekrotisch freigesetzt und stimulieren angeborene Immunzellen [87]. Ubiquitin hingegen hemmt die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte TNF- α -Freisetzung [43]. Da die „Alarmino“ einige Signalwege mit den Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) teilen, ist die Benutzung hochreiner Proteine und Chemikalien notwendig. Bei Nekrose freigesetzte HSP kommen in Kontakt mit den sie umgebenden Zellen [41, 88] und werden schnell aufgenommen [89, 90]. Dabei vermitteln sie unterschiedliche Effekte auf Zellen des Immunsystems, unter anderem durch die Toll-Like Rezeptor (TLR) 2 und TLR 4 [89, 91, 92]. Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, an welche Rezeptoren die HSP noch binden können. CD91 wurde als Rezeptor für HSP70, HSP90, gp96 und Calreticulin identifiziert [93, 94]. Beim HSP60 ist bisher nur bekannt, dass TLR 2 und TLR 4, sowie CD14 für eine Signalübertragung nötig sind [89, 92, 95], diese jedoch nicht die Rezeptoren für HSP60 darstellen [91, 96]. Gerade bei den HSP wurde immer wieder diskutiert, dass es sich bei ihrer Wirkung um Kontaminationseffekte mit LPS handelt. Beide Moleküle binden an den TLR4, und es wurde eine TNF- α -Induktion beschrieben [92]. Die verwendeten rekombinanten Proteine wurden aus *E.coli* isoliert und könnten daher mit Endotoxinen belastet sein. Eine Stimulation mit LPS ergibt selbst bei geringen Dosen eine Erhöhung der TNF- α -Sekretion aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mono Nuclear Cells, PBMNC). Durch die Verfügbarkeit hochaufgereinigter Proteine konnte allerdings gezeigt werden, dass HSP kein TNF- α freisetzen [97, 98], sondern

Kontaminationen mit LPS in den verwendeten Proteinen dafür verantwortlich waren [99]. Der Nachweis, dass HSP60, aber nicht LPS, in der Lage ist, Interferon α (IFN- α) zu induzieren zeigt deutlich, dass es unterschiedliche Signalwege zwischen HSP und LPS geben muss [100]. Zusätzlich ist exogenes HSP70 in der Lage, die Phagozytose-Aktivität von Makrophagen zu erhöhen [101] und schützt Ratten vor Endotoxin-Schock [102]. Unter bestimmten Voraussetzungen können HSP nach ihrer Synthese umverteilt werden und an der Zelloberfläche auftreten [103], ohne dass ein Gewebeschaden vorliegt. Zusätzlich zu ihrer Rolle als Chaperone können HSP auch als Transporter für Peptide zum Major Histocompatibility Complex class 1 (MHC-I) dienen und dabei sowohl zytotoxische T-Zellen [104, 105] als auch Muskel- und Endothelzellen aktivieren [106]. Diese Fähigkeit würde darauf hindeuten, dass HSP, sofern sie durch Nekrose freigesetzt werden [41], als Gefahrensignale dienen können. Die Inkubation von dendritischen Zellen und Makrophagen mit HSP60 führt zu einer pro-inflammatorischen Reaktion und erhöht die co-stimulatorischen Moleküle auf dendritischen Zellen [92, 95, 107]. Ähnliche Ergebnisse wurden für HSP70 gefunden [108]. Dabei muss das HSP nicht löslich vorliegen, sondern kann selbst an einer Zelloberfläche gebunden noch agieren [109]. Die stimulatorische Aktivität des HSP70 könnte dabei eine Rolle in der Verbindung von Toleranz und Autoimmunität spielen [110].

Es scheint bei den HSP unterschiedliche, sogar entgegengesetzte Wirkungen zu geben, je nachdem wo sie freigesetzt werden. Intrazellulär schützen sie die Zelle, während extrazelluläres HSP pro-inflammatorische Wirkung zeigt. Das Auffinden von HSP außerhalb von Zellbestandteilen wie Serum scheint mit bestimmten Erkrankungen zusammenzuhängen. So wurden HSP60 und HSP60 Antikörper im System von Patienten mit Atherosklerose, Diabetes mellitus und Arthritis gefunden. Dabei wurde vorgeschlagen, diese als Autoantigene einzustufen [68, 111, 112]. Da Endothelzellen von atherosklerotischen Tieren HSP60 auf der Zelloberfläche präsentieren, scheint dies ein anderer Weg der Aktivierung von Immunzellen zu sein [113]. Bei sogenannten chronischen Entzündungen wurden die HSP erneut extrazellulär nachgewiesen und als Immunmodulatoren diskutiert [114].

Erhöhte Konzentrationen an HSP wurden bei schwerverletzten Patienten gefunden und scheinen durch einen großen Weichteilschaden freigesetzt worden zu sein [41, 42]. Ob HSP dabei an der Entstehung und dem Verlauf von SIRS und CARS beteiligt sind, ist jedoch nicht nachgewiesen. HSP70 ist dagegen bei Operationen am offenen Herzen erhöht und vermittelt unter Umständen eine inflammatorische Reaktion [115].

1.5. Ziele der Arbeit

Polytrauma-Patienten entwickeln eine inflammatorische Reaktion, welche häufig mit Immunsuppression und infektiösen Komplikationen einhergeht. Da schwerverletzte Patienten eine ganze Reihe von unterschiedlichen Verletzungen aufweisen, welche unterschiedlichste Wirkungen auf die Physiologie haben können, ist es unmöglich festzustellen, welche der Effekte auf den hämorrhagischen Schock, Schädel-Hirn-Trauma, Thorax-Trauma oder den Weichteilschaden zurückzuführen sind. In einer Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass ein Weichteiltrauma zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer bakteriellen Infektion führt [116].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Beteiligung eines Weichteiltraumas an der Entwicklung einer Immunsuppression und an der Modulation der zellulären Homeostase untersucht werden. Ein Fokus lag dabei auf der Rolle von Hitze-Schock-Proteinen (HSP), die aus dem verletzten Gewebe freigesetzt werden könnten und im Serum von schwer verletzten Patienten nachgewiesen werden konnten [41, 42].

Dazu wurden zwei Modelle genutzt. Material von Patienten, die einer elektiven Operation unterzogen wurden, diente zur Untersuchung der lokalen und systemischen Veränderung nach Weichteiltrauma. Dazu wurden die Mono-Nukleären Zellen (MNC) der Wundflüssigkeit (Drainageflüssigkeit aus der operativen Wunde), repräsentativ für die Immunantwort am Ort des Traumas, mit denen aus dem peripheren Blut, als Vergleich zur systemischen Immunantwort, in ihrer Reaktion auf LPS verglichen. Außerdem sollten mögliche Veränderungen der zellulären Homeostase im Blut und im geschädigten Gewebe anhand der Blutproben und der Wundflüssigkeit überprüft werden.

Zur Untersuchung der Zellinfiltration in den geschädigten Muskel und der Wirkung eines definierten Weichteiltraumas wurde ein Mausmodell für ein stumpfes Weichteiltrauma genutzt. Dieses Modell diente der Untersuchung der lokalen Veränderungen im geschädigten Gewebe bezüglich der zellulären Homeostase. Ein Mausstamm, der HSP70 als Transgen überexprimiert, ermöglichte dabei, die Rolle von HSP70 an den Vorgängen nach Weichteiltrauma zu bestimmen. Die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse dienen dem besseren Verständnis der Auswirkungen eines Weichteiltraumas auf das Immunsystem und könnten für die Entwicklung einer verbesserten Therapie von Polytrauma-Patienten hilfreich sein.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse“ und, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen, sofern sie für die Zellkultur verwendet wurden, steril filtriert beziehungsweise autoklaviert. Alle Reagenzien waren dabei entweder frei von Endotoxin oder lagen unterhalb eines vom Hersteller angegebenen Schwellenwertes. Die Kontamination mit LPS/Endotoxin wurde mit einem Limulus Amoebocyte Assay (LAL) (Bio Whittaker, MD, USA) überprüft. Alle Angaben in Prozent (%) sind gewichtsspezifisch berechnet (W/Vol), alle Lösungen volumenspezifisch (Vol/Vol).

2.1.2 Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, die Chemikalien der unter 2.1.1 angegebenen Firmen verwendet. Als Lösungsmittel wurde Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) verwendet. Das in der Zellkultur und bei der Aufreinigung von Zellen eingesetzte PBS wurde von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und besaß sehr geringe Endotoxinwerte (≤ 1 EU/ml). Die Puffer und Lösungen, die Anwendung in der Zellkultur fanden, wurden vor Gebrauch mit einem 0,22- μ m Filter steril filtriert.

2.1.2 Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedium wurde Very Low Endotoxin Medium VLE RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet. Dieses wurde mit 2 mM L-Glutamine, 0.06 mg/ml Penicillin und 0.02 mg/ml Gentamicin versetzt. Für die Kultivierung von humanen PBMNC oder MNC (periphere Blut mononukleäre Zellen/ mononuclear Cells) wurde das Medium mit 5 % autologem Serum versetzt.

2.1.3 Zell-Linien

Die verwendete C2C12 Skelettmuskelzelllinie der Maus wurde von American Type Culture Collection (Manassas, VA) bezogen und subkonfluent in DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 1 mM Pyruvat mit 4 mM Glutamin, Penicillin / Streptomycin (50 U /ml / 50 U /ml) und 20 % fötalem Kälberserum kultiviert. Bei Konfluenz der Myoblasten wurden die Zellen zu Myotubes differenziert durch Wechsel des Kulturmediums auf DMEM mit 2 % Pferdeserum. Die Experimente wurden vier bis sieben Tagen nach der Differenzierung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt kontrahierten die Myozyten spontan und hatten einen gestreckten Phänotyp.

2.1.4 Antikörper, Lösungen und Puffer für durchflusszytometrische Analysen

Für die Analyse von Zellen bezüglich ihrer Oberflächen-Rezeptoren und für die Bestimmung von intrazellulären Zytokinmengen mittels Durchflusszytometrie wurden Antikörper in unterschiedlichen Kombinationen verwendet. Bezogen wurden die Antikörper von BD Biosciences (Heidelberg), eBiosciences (Frankfurt am Main), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) und Caltag Laboratories/Invitrogen (Karlsruhe). Die jeweilige Bezugsquelle, Farbstoff-Konjugation und der Klon, aus dem die Antikörper generiert wurden, sind im jeweiligen Versuch angegeben. Zum Blocken von unspezifischen Antikörperbindungen bei Mauszellen diente gereinigtes Maus IgG der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Als Lösung für die Verdünnung der verwendeten Antikörper und für die Waschschrte wurde Cellwash® der Firma BD Biosciences (Heidelberg) benutzt. Für die Permeabilisierung und Fixierung der Zellen bei den intrazellulären Färbungen wurde Cytoperm/Cytofix™ (BD Biosciences) und für die Waschschrte nach der Permeabilisierung wurde ein Permeabilisierungspuffer (BD Biosciences) verwendet.

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Die Plastik-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen BD Falcon (Heidelberg), Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen), Starlab GmbH (Ahrensburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.1.6 Labor-Geräte

Für die Zentrifugationsschritte im Rahmen der Zellkultur wurde die Zentrifuge „Varifuge 3.0RS“ (Heraeus Christ Osterode) verwendet und die sterilen Arbeiten wurden an einer „antairBSK“ Sterilbank der Firma Bio-Flow Technik (Mannheim) durchgeführt. Das Mikroskop „Axiovert 25“ von Carl Zeiss Jena GmbH (Jena) wurde benutzt, um kultivierte Zellen zu beobachten. Zur Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die isolierten Zellen unter dem Mikroskop „AxioStar“ (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) gezählt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator „Forma Scientific“ der Firma Thermo Life Sciences (Egelsbach). Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACSCalibur® von BD Biosciences (Heidelberg) verwendet. Für Messungen der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurde ein Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808 (Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) genutzt.

2.2 Versuchstiere

Die als Versuchstiere verwendeten männlichen Mäuse des Stammes BALB/c wurden von Harlan Laboratories (Borchen, Deutschland) bezogen. Sie wurden im Alter von 11-14 Wochen für die Versuche verwendet. Der verwendete transgene Mausstamm HSP70TG wurde aus dem CB6F1 CMVIE Stamm von Dr. W. H. Dillmann (University of California, San Diego) [117, 118] auf BALB/c-Hintergrund zurückgezüchtet und im Alter zwischen 11 und 15 Wochen verwendet. Alle Mäuse wurden entsprechend der Vorgaben des Zentralen Tierlaboratoriums (ZTL) Essen in Schall-geprüften Räumen bei gleichmäßiger Temperatur von 24,0 ± 0,5 °C bei einem 12 Stunden hell/dunkel Zyklus gehalten. Die Mäuse hatten Zugang zu Standard-Nager-Futter und Wasser ad libitum. Vor der Verwendung als Versuchstier wurden alle Mäuse mindestens eine Woche im ZTL akklimatisiert. Alle Tierversuche wurden nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung Düsseldorf freigegeben.

2.3 Patienten

Tabellarisch sind die Patienten aufgelistet, deren Blut und Wundflüssigkeit für den Abschnitt 3.1 verwendet wurden.

Tabelle 2.1 Verwendete Patienten für Abschnitt 3.1					
Anzahl	Frau/Mann	Alter [Jahre]	Operationsart	Dauer der Operation [Minuten]	Komplikationen
21	16/5	76±13	TEP nach Fraktur (9) TEP aufgrund Athritis (5) TEP Revision (1) Bipolare Hemiathroplastie (4) Osteosynthese (2)	151±67	Myokardinfarkt (1) Infektion (1) Subcutanes Serom (1) Apoplexie (3)
Totale Endo-Prothese (TEP)					

Für die Übersichtstabelle 3.3 im Ergebnissteil wurden die Proben von 54 Patienten (30 weibliche / 24 männliche) im Alter zwischen 24 und 92 Jahren untersucht.

2.4 Methoden

2.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Wundflüssigkeit

PBMNCs (Peripheral Blood MonoNuclear Cells, Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden mithilfe eines Ficoll-Dichtegradienten gewonnen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation, bei der die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen während der Zentrifugation überwiegend von der Zellgröße, Dichte und Viskosität des Trennmediums abhängt. Der verwendete Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin) ist ein Saccharose-Polymer mit einer spezifischen Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^3$.

Zur Isolation wurde den Patienten Blut in 9 ml Ammoniumheparinat-beschichteten Monovetten (S-Monovette[®]; Sarstedt, Nümbrecht) oder, für die Serumgewinnung, in 9 ml Serum-Monovetten (S-Monovette[®]; Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen in 50 ml Falcon Röhrchen überführt, mit sterilem, Endotoxin-unbelastetem PBS (Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eins zu zwei verdünnt und auf einen Ficoll-Dichtegradienten (15 ml) überschichtet. Die Trennung der PBMNC von den Erythrozyten erfolgte mittels Zentrifugation bei 1500 rpm, 490 g, 35 Minuten und 21 °C ohne Bremse. Es bildete sich ein Pellet (Sediment) aus Erythrozyten und einem Großteil der Granulozyten. Auf der Grenze zwischen Ficoll und PBS/Serum bildete sich eine Interphase als sichtbarer „Ring“ aus MNC. Dieser wurde vorsichtig abgenommen, in PBS resuspendiert und bei 1200 rpm, 300 g, zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach noch einmal mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in autologem Medium (Zellkulturmedium mit 5 % autologem Serum) aufgenommen. Die Zellen wurden in Trypan Blue (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in gewünschter Konzentration ausgesät. Die Vitalität der Zellen wurde durch das Trypan Blue überprüft (ungefärbte Zellen) und lag bei über 95 %. Vor der Stimulation wurden die Zellen eine Stunde im Brutschrank ruhen gelassen. Als Kontrolle wurde jeweils das Blut freiwilliger Probanden genutzt und nach demselben Protokoll aufgereinigt.

Für die Aufreinigung mononukleärer Zellen aus Wundflüssigkeit wurden die Redon-Flaschen (Drainage-Flaschen) steril geöffnet und die Wundflüssigkeit eins zu drei mit sterilem, Endotoxin-unbelastetem, PBS verdünnt. Danach wurden die Zellen nach demselben Protokoll isoliert.

Verwendete Materialien:

S-Monovette[®]; Sarstedt, Nümbrecht
Multi-Adapter; Sarstedt, Nümbrecht
ECOFLO[®]-Perfusionsbesteck; Dispomed[®], Gelnhausen
Cutasept[®] F Hautdesinfiziens; Bode Chemie, Hamburg
D-PBS, Endotoxin-getestet; GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Kulturmedium: VLE RPMI 1640 (*Very Low Endotoxin*); Biochrom AG, Berlin.
Dem Medium wurden 1% (v/v) L-Glutamin und 1 % (vol/vol) Penicillin/Streptomycin zugesetzt.
L-Glutamin 200mM; Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin 10.000 U/ml /Streptomycin 10 mg/ml; Sigma Aldrich, Taufkirchen
LPS (Lipopolysaccharide E.coli 026:B6); Sigma Aldrich, Taufkirchen;
Varifuge 3.0 RS; Heraeus Instruments Osterode

2.4.2 Gewinnung zellfreier Wundflüssigkeit

Zur Gewinnung zellfreier Wundflüssigkeit wurden die Drainageflaschen steril geöffnet und die Wundflüssigkeit entnommen. Durch eine Zentrifugation bei 1200 rpm (300 g) wurden die Zellen entfernt und der Überstand bei -80 °C bis zur Benutzung gelagert.

2.4.3 Stimulation der mononukleären Zellen in der Zellkultur

Die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNC wurden je nach Versuchsaufbau in 6, 24, 48 oder 96-Well Platten in 3, 2, 0,5 oder 0,2 ml mit einer Zelldichte von ein bis zwei Millionen Zellen pro ml ausgesät. Es wurde ausschließlich autologes und Endotoxin freies Medium verwendet. Vor der Stimulation wurden die Zellen eine Stunde ruhen gelassen. Stimuliert wurde mit zellfreier Wundflüssigkeit, Lipopolysaccharid (LPS; E.coli. 026:B6 Sigma Taufkirchen) oder rekombinantem HSP60 und HSP70 (Stressgen, Victoria, Kanada). Zur Bestimmung der löslichen Zytokine und Chemokine wurden die Platten abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C bis zur Messung verwahrt.

2.4.4.1 Nachweis von löslichen Zytokinen oder Chemokinen mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Detektion und Quantifizierung löslicher Zytokine und Chemokine in verschiedenen Überständen und Homogenaten wurden Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Bei dieser erstmals von Engvall und Perlman [119] etablierten Methode handelt es sich um eine Immunreaktion an einer Festphase. Dabei können die Antigene nicht nur nachgewiesen, sondern auch quantifiziert werden.

Die hier verwendeten ELISA-Methoden beruhen dabei auf der Sandwich-Technik, welche zu den nicht kompetitiven Techniken zählt. Dabei wird zuerst ein Antikörper an eine Flachbodenplatte aufgrund von hydrophoben Interaktionen mit dem Kunststoffmaterial unspezifisch und nicht-kovalent an den Plattenboden gebunden. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper (Waschen) werden die nicht besetzten Absorbtiionsstellen mit Proteinen (z.B. BSA oder Serum) abgedeckt (Blocken), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach weiterem Waschen wird die zu untersuchende Probe aufgebracht und

während der Inkubation binden Antigene spezifisch an die Antikörper. Nach Entfernen der Proben wird mit einem Biotin-konjugierten Zweitantikörper inkubiert, welcher durch Bindung an das Antigen den so genannten Sandwichkomplex ausbildet. Durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates (Streptavidin-Horseradish Peroxidase, HRP) und anschließend des Substrates (Tetramethylbenzidin, TMB) erfolgt eine enzymatische Substratumsetzung. Die durch die Peroxidase umgesetzte Substratmenge ist dabei proportional zur Konzentration des Antigens und über eine mitgeführte Standardkurve kann die Antigenmenge photometrisch quantifiziert werden.

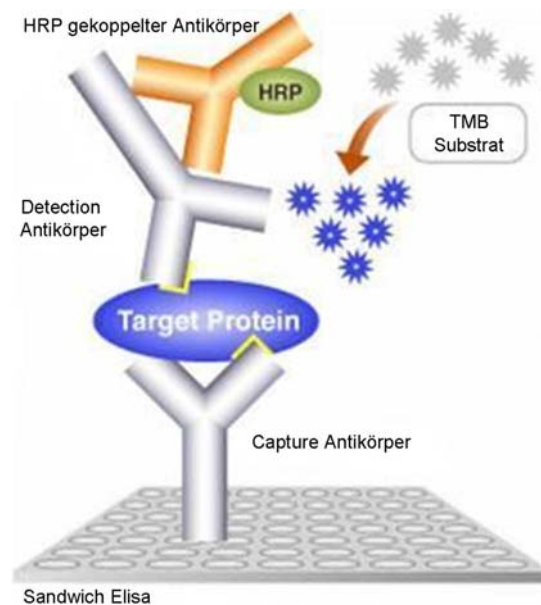


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Methode des Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Der auf einer Platte immobilisierte Capture Antikörper bindet das Ziel-Protein, zum Beispiel ein bestimmtes Zytokin. Der Detection Antikörper bindet das Zielprotein an einer anderen Stelle, so dass ein Sandwich-Komplex entsteht. Durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, der an den Detection Antikörper bindet und mit einer Horseradish Peroxidase verbunden ist, können die Antigene detektiert werden, da das Enzym ein zugefügtes Substrat zu farbigen Produkten umsetzen kann. (Cell Signaling Technology®)

2.4.4.2 Human IL-8, TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES, HSP70 ELISA

Die verwendeten ELISA der Firma R&D Systems wurden nach Herstellerangaben verwendet. Für das Coaten der Flachbodenplatte wurden die Primärantikörper in PBS verdünnt und über Nacht in einem Volumen von 100 μ l pro Well inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit 250 μ l Blockierlösung (BSA) für mindestens eine Stunde blockiert und nach weiterem Waschen die Proben aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde eine serielle zweifache Verdünnung des Standards mitgeführt. Nach einer zweistündigen Inkubation wurde erneut

gewaschen und der HRP gekoppelte Zweitantikörper zugegeben. Nach einer weiteren Stunde mit dreimaligem Waschen wurde die Substratlösung zugegeben und bei einer ausreichenden Färbung mit zwei N Schwefelsäure die Reaktion abgestoppt. Bei der Bestimmung von HSP70 wurde ein ELISA der Firma Stressgen benutzt, bei dem alle Komponenten im Kit enthalten waren. Auch hier wurde der Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Absorptionen wurden mittels eines Mikropplatten-Absorptionsreaders bestimmt. Die Konzentrationen der zu untersuchenden Zytokine wurden mit Hilfe des Programms MikroWin (Version 3.0, Mikrotek Laborsysteme GmbH) anhand der Standardkurve berechnet.

2.4.4.3 Maus KC, MCP-1, MIP1 α TNF- α ELISA

Die ELISA für die Bestimmung der Chemokine und Zytokine bei der Maus wurden ebenfalls nach obigem Prinzip nach Herstellerangaben durchgeführt. Es handelte sich ebenfalls um Duosets der Firma R&D Systems. Der ELISA zur Bestimmung von TNF- α wurde von BioSource (Solingen) bezogen und nach Herstellerangabe durchgeführt.

2.4.5 Durchflusszytometrie und Fluorescence Associated Cell analyses

Die Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry) ist eine Technik, um physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen zu charakterisieren und zu messen. Dazu fließen die Zellen oder Partikel einzeln in einem laminaren Flüssigkeitsstrom (hydrodynamische Fokussierung) durch einen fokussierten Laserstrahl. Während der Messung können so physikalische Eigenschaften wie Größe und Granularität bzw. innere Komplexität eines Partikels gemessen werden. Die Identifikation zellulärer Bestandteile, sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche, wird mithilfe spezifischer Antikörper ermittelt, die direkt oder indirekt mit spezifischen Fluorochromen markiert sind.

Das Durchflusszytometer besteht im Wesentlichen aus drei Teilen. Dem fluiden System, um die Zellen in einem vereinzelteten Strom durch die Messzelle zu leiten; dem optischen System bestehend aus Laser, optischen Spiegeln und Filtern, zur Detektion der Fluoreszenz und Komplexität; und dem elektronischen Teil zur Auswertung der gemessenen Parameter. Beim so genannten FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) ist den drei Bestandteilen des flow cytometers noch ein System zur Trennung der Partikel nach Eigenschaften nachgeschaltet.

Wenn die Zellen den monochromatischen Laserstrahl kreuzen, messen Photomultiplikatoren die Streuung des Laserlichts. Je nach Modell des FCM werden pro Zelle (oder event) bis zu 6 Signale erfasst. Zwei davon beschreiben die Morphologie der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) ist proportional zur Größe, das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) ist proportional zur Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit, Granularität, Plasma/Kern-Verhältnis) einer Zelle. So lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) abgrenzen. Monozyten zeigen dabei ein intermediäres Verhalten.

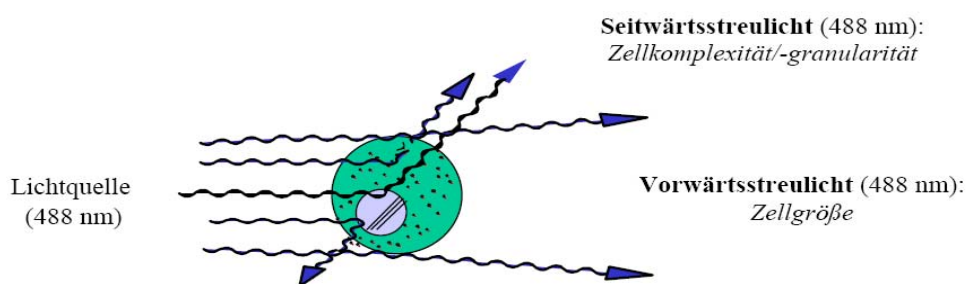


Abbildung 2.2 Lichtstreuereigenschaften einer Zelle.

Der Forward-scatter Detektor (FSC) detektiert das üblicherweise bis zu einem 20° Winkel ausgelenkte Licht in Laserrichtung und zeigt die Größe der Zelle an. Der Side scatter Detektor (SSC) erfasst das seitwärts gestreute Licht und zeigt die Granularität und Komplexität der Zelle an. (nach BD FACS Guide)

Die so gewonnen Daten können zur ersten Einordnung der Zelltypen und dem Trennen von Zelltrümmern verwendet werden. Um die Zellen weiter zu identifizieren, werden bei dem verwendeten Durchflusszytometer die Emissionen verschiedener Fluorochrome (FL1 / FL2 / FL3/ FL4) gemessen. Das verwendete FCM verfügt über vier Kanäle.

Verwendete Fluorochrome:

- FITC (Fluorescein Isothiocyanat)
- PE (Phycoerythrin)
- PerCP-Cy5.5 (Peridinin-chlorophyll-protein complex-cyanine 5.5)
- APC (Allophycocyanin)

Kanal

- FL-1
- FL-2
- FL-3
- FL-4

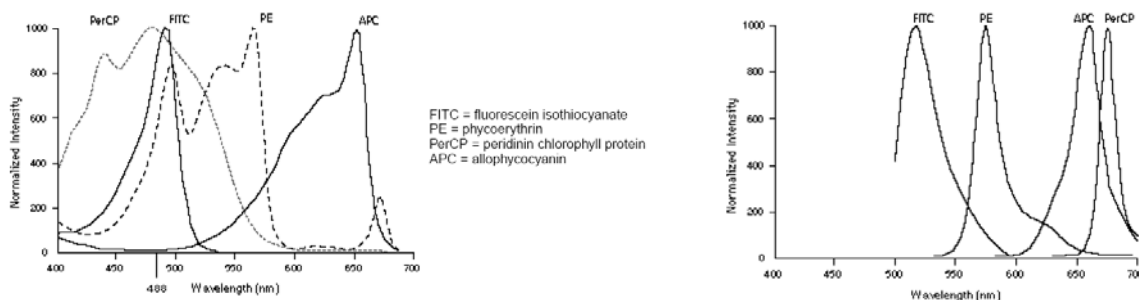


Abb. 2.3 Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum der vier Fluorochrome (nach BD FACS-Guide)

Die Fluorochrome werden dabei durch die beiden eingebauten Laser angeregt. Dabei absorbieren die Fluorochrome FITC, PerCP und PE bei 488 nm die Wellenlänge des Argon-Lasers (488 nm, blau) und APC wird durch einen zusätzlichen Dioden-Laser (635 nm, rot) angeregt. Die Emissionsspektren liegen dann soweit auseinander, dass eine unterschiedliche Detektion möglich ist. Bei einer Färbung mit APC und PerCP muss daher ein PerCP Cy5.5 verwendet werden, um den Emissionsbereich vom APC wegzubewegen. Durch die Färbung mit spezifischen Antikörpern können in diesem Fall also vier unterschiedliche Eigenschaften einer heterogenen Zellpopulation untersucht werden und somit die Zellen klassifiziert werden. Dabei hat die Methode der Durchflusszytometrie den Vorteil, dass man sehr viele Zellen in kurzer Zeit bestimmen und untersuchen kann. Man erhält dabei keinen Mittelwert, sondern einen Wert für jede einzelne Zelle. Auf diese Weise können Populationen genau und schnell untersucht werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde das FACSCalibur® der Firma BD Biosciences (Heidelberg) verwendet, welches über keine Zellsortierung verfügt.

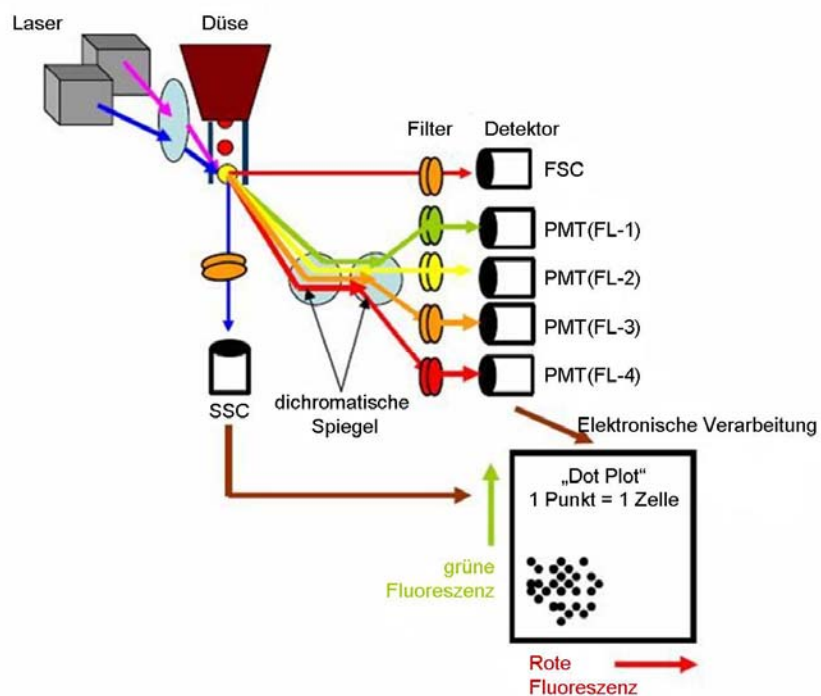


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

2.4.6 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen ($0,5-1 \times 10^6$) in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und mit Cell Wash (BD) gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren bei 460 g für

sechs Minuten und 4 °C wurde der Überstand verworfen, die Zellen durch Schütteln gelöst und in 50 µl Cell Wash resuspendiert.

Mausmuskelzellen:

Bei der Färbung von Mauszellen wurde das Cell Wash mit 0,1 mg/ml Maus IgG supplementiert und für sechs Minuten im Dunklen bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Nach dem Blocken wurden die Antikörper als Cocktail in 50 µl Cell Wash zugegeben. Zur Färbung wurden folgende Antikörper verwendet: Anti-Gr-1 FITC für Granulozyten, anti-CD45-PE für Lymphozyten, anti-F4/80-APC zur Identifikation von Makrophagen, anti-11b PerCP-Cy5.5 für T-Zellen und anti-11c-APC für dendritische Zellen. Der Antikörpercocktail wurde vorher für alle Zellen angesetzt und danach auf die wells verteilt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen zweimal mit Cell Wash resuspendiert, bei 460 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 200 µl Cell wash resuspendiert und in Facsröhrchen, in denen 50 µl Cell Wash vorgelegt waren, überführt. Bis zur Messung wurden die Zellen im Dunkeln bei 4 °C maximal zwei Stunden gelagert.

Bei den Färbungen von Muskelzellen in TrueCount (TC)-Röhrchen (BD) wurde die gesamte Färbung in TC-Röhrchen durchgeführt. Nach Zugabe der gewaschenen Zellen (100 µl Zellsuspension) wurden die Zellen im Röhrchen mit dem Antikörpercocktail 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Zur Messung wurde das Volumen auf 500 µl erhöht und direkt im FACS Calibur gemessen.

Humane Zellen:

Bei der Bestimmung der Zellzusammensetzung wurden 50 µl Vollblut oder Wundflüssigkeit in TrueCount Röhrchen überführt und mit 20 µl Antikörpercocktail mit anti-CD3-FITC, anti-CD45-PE (Multitest; BD) und 2 µl anti-CD14-APC (Miltenyi) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden danach mit 450 µl FACS Lyse Puffer (BD) für 10 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu entfernen. Die Zellen wurden danach nach Größe, Granularität und folgendem Schema klassifiziert: CD3⁻CD14⁺CD45⁺ Monozyten, CD3⁻CD14⁻CD45⁺ Granulozyten, CD3⁺CD14⁻CD45⁺ Lymphozyten.

Intrazelluläre Färbung:

Um die Stimulation einzelner Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in 24-well Low Attachment-Platten (Corning Costar, 3×10^6 Zellen pro well/ml) ausgesät. Die Zellen wurden mit 1 ng/ml LPS für 30 Minuten stimuliert und danach für 2 Stunden mit Monensin (0,66 µl/ml, Golgi stop; BD) inkubiert. Monensin ist ein Inhibitor des intrazellulären Proteintransportes. Dies führt zu einer Akkumulation der Zytokine innerhalb der Zelle und des Golgi-Komplexes, wodurch die produzierenden Zellen eindeutig detektiert werden können. Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und bei 460 g und 4 °C für sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µl Cell Wash resuspendiert. Danach wurde, wie oben beschrieben, die Oberflächenfärbung mit CD14 durchgeführt. Nach der Färbung mit CD14 wurden die Zellen mit Cytotfix/Cytoperm (BD) für 20 Minuten fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde TNF intrazellulär mit anti-TNF- α -FITC (BD) für 15 Minuten gefärbt, mit Permeabilisierung-Puffer (BD) gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt.

Für alle Färbungen wurden entsprechende Isotypkontrollen durchgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem FACSCalibur (BD Bioscience) und wurde mithilfe der CellQuest pro Software (BD) analysiert. Dabei wurden die Populationen erst nach Größe und Granularität und danach anhand der Oberflächenmarker klassifiziert.

Verwendete Materialien:

- 96-Well Rundbodenplatten Nunc Biotechnologies
- Cell-Wash BD Bioscience
- FACS Röhrchen 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Falcon, Erembodegem, Belgien
- FACS Flow BD Biosciences
- GolgiStop® (Monensin), BD Biosciences
- Low Attachment-Platten; Ultra Low Cluster/ Ultra Low Attachment, Corning Incorporated, NY, USA; Costar
- Cytotfix/Cytoperm™, BD Biosciences
- Perm/Wash™ Buffer, BD Biosciences
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Gibco

Verwendete Antikörper:

Maus:

- Gr-1 FITC Immunotools, Friesoythe
- CD45 PE Immunotools
- F4/80 APC Acris
- CD11b PerCp BD Biosciences
- CD11c APC Armenien Hamster eBioscience

Human:

- CD3 FITC CD45 PE Cocktail Multitest; BD Biosciences
- CD14 APC (TUK4) Miltenyi
- TNF- α PE (Mab11) BD Biosciences
- TLR4 FITC (HTA125) eBiosciences

2.4.8 Proteinverdau mit Agarose-gekoppelter Proteinase K

Der Verdau von rekombinatem HSP oder Wundflüssigkeit wurde mit Agarose-gekoppelter Proteinase K (Sigma) im Vergleich zu Agarose-gekoppeltem Protein G (Sigma) durchgeführt (47 U/g, angenommene Aktivität vergleichbarer löslicher Proteinase 30 U/mg). Die benötigte Proteinase wurde in PBS mit 10 % EtOH über Nacht bei 4 °C quellen gelassen und am nächsten Tag dreimal mit RPMI 1640 Medium ohne Zusätze resuspendiert, bei 300 g zentrifugiert und dadurch gewaschen. Der Verdau wurde in Glasröhrchen bei 37 °C für 10 Stunden (Wundflüssigkeit) oder 3,5 Stunden (rekombinantes HSP) durchgeführt. Die Ansätze wurden regelmäßig gevortext und nach Ablauf der 10 bzw. 3,5 Stunden bei 1500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert, mit doppelt substituiertem Zellkulturmedium eins zu zwei aufgenommen und in die Versuche eingesetzt.

2.4.9 Gesamtprotein-Bestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay Kits II (Bio-Rad Laboratories, USA) basierend auf der Proteinbestimmung nach Lowry [120] quantitativ bestimmt. Sie beruht auf zwei Reaktionen: Die Bestimmung erfolgt über die BIURET-Reaktion (Blauviolette Färbung durch Reaktion von -CO-NH- Gruppen mit Cu-II-Ionen im alkalischen Milieu). In einem zweiten Schritt reduziert dieser Biuret-ähnliche Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren, Reaktion auf phenolische OH-Gruppen). Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt, da die Intensität der entstehenden blauen Färbung proportional zur Konzentration des Proteins ist. Durch Bestimmung der Extinktion kann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration an Protein ermittelt werden.

In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden als Referenz 2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,03125 mg/ml BSA als Standardkurve aufgetragen und je 5 µl der zu untersuchenden Probe in Dublikaten aufgetragen. Dazu wurden je 20 µl der Lösung A' (1 ml Lösung A und 25 µl Lösung S) gegeben und jeweils 200 µl Lösung B. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurden eventuelle Luftblasen entfernt und die Proben im ELISA-Reader bei 660 nm ausgelesen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der aufgetragenen Eichkurve berechnet.

Verwendete Materialien:

DC Protein Assay Reagenz A der Firma Bio-Rad Laboratories, USA

DC Protein Assay Reagenz B der Firma Bio-Rad Laboratories, USA

DC Protein Assay Reagenz S der Firma Bio-Rad Laboratories, USA

Albumin Standard: BSA 2 mg/ml in 0,9 % NaCl der Firma Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

Die Bestimmung von Creatin Kinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), freiem Hämoglobin und Myoglobin wurden vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen bestimmt.

2.4.10 Immunpräzipitation

Da ein direkter Nachweis von HSP60 im Western Blot aufgrund der zu geringen Konzentration nicht möglich war, wurde eine Immunpräzipitation des HSP60 durchgeführt.

Bei der Immunpräzipitation wird ein Protein aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Dabei entsteht durch die Bindung spezifischer Antikörper entweder sofort ein Präzipitat, oder es wird zusätzlich an beads (z.B. Agarose) gekoppelt. Die resultierenden Präzipitate werden danach durch Zentrifugation gesammelt und aufgereinigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunpräzipitation in mehreren Schritten durchgeführt. Alle Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Proteine zu vermeiden, wurde den Puffern die angegebene Menge NP40 zugegeben.

250 µl zellfreie Wundflüssigkeit (WF) oder Lysat (Überstand nach Proteinbestimmung) wurden eins zu zwei mit Probenpuffer verdünnt und mit gewaschener Ziegen-IgG gekoppelter Agarose für eine Stunde über Kopf gerollt. Nach Abzentrifugation bei 1100 g wurde erneut für 1,5 Stunden mit Ziegen-IgG Agarose gerollt. Währenddessen wurde anti-HSP60 Agarose gewaschen. Die Proben wurden mit der anti-HSP60 Agarose über Nacht im Kühlraum gerollt. Am nächsten Morgen wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 20 µl abgesaugt. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und für die SDS-Page verwendet.

Nachweis von HSP60

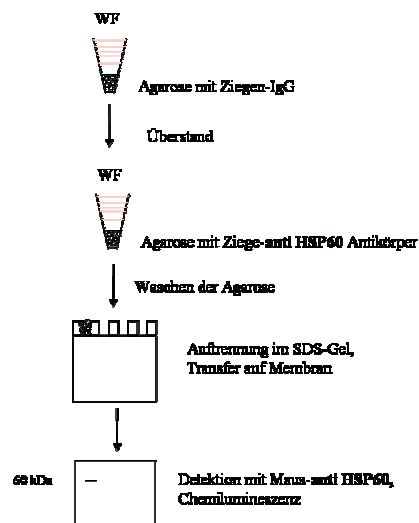


Abb. 2.5 Verlaufsprotokoll für den Nachweis von HSP60 in Wundflüssigkeit oder Lysaten

Verwendete Materialien und Puffer

Anti-HSP60 Agarose (HSP60 K-19 AC, Santa Cruz, Heidelberg)

Goat IgG Agarose (Goat IgG AC, Santa Cruz, Heidelberg)

PBS (D-PBS –Mg –Ca, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)

Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten (Complete EDTA free, Roche, Mannheim)

Verdünnungspuffer:

1 Tablette Protease-Inhibitor Cocktail auf 25 ml PBS (GIBCO)

Probenpuffer:

Verdünnungspuffer mit 1 % NP40 (Nonidet P 40, Fluka Seelze)

Waschpuffer:

Verdünnungspuffer eins zu zwei mit PBS und 2,5 % NP 40

2.4.11 SDS-Page

Die zu untersuchenden Lösungen wurden mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli aufgetrennt. Das Polyacrylamid bildet entsprechend dem Ausgangsgehalt an Acrylamid/Bisacrylamid hochvernetzte Polymere aus, in denen Proteine nach Größe und nicht nach Ladung aufgetrennt werden. Durch die Anlagerung von SDS erhalten alle Proteine eine einheitliche (negative) Ladung, wodurch sie im elektrischen Feld ungeachtet ihrer eigenen Ladung, in eine Richtung wandern. Zum Erstellen von Gelen wurde die Minigel-Apparatur der Fa. Biometra (Göttingen) verwendet. Die Glasplatten wurden mit Aqua dest., Ethanol und Aceton gereinigt und zusammengesetzt. Die Proben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und nach 5-minütigem Aufkochen bei 96 °C gekühlt und abzentrifugiert. Die Taschen des auspolymerisierten Polyacrylamidgels wurden gespült, mit Proben befüllt und ein Marker als Vergleichsstandard aufgetragen (Magic Marker, Invitrogen, Karlsruhe). Die Elektrophorese wurde bei ca. 25 mA

gestartet und, sobald die Proben ins Gel gewandert waren, mit ca. 30 -35 mA fortgesetzt, bis die blaue Bromphenolbande des Probenpuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte (die Spannung darf 100 V dabei nicht übersteigen, da ansonsten die Gefahr des Überhitzens des Gels besteht).

Es wurden Gele in einer Biometra Apparatur nach folgendem Rezept gegossen:

10 % Polyacrylamidgele:

6,3 ml 30 % Acrylamid-bisAcrylamid 37,5:1,

4 ml Lösung B,

6 ml 10 M Harnstoff,

2,7 ml Aqua bidest.,

15 µl TEMED,

1 ml 1,5 % APS

Lösung B: 0,5 M Tris, 0,5M Bicin, 0,5 % SDS

Laufpuffer: Lösung B (1:5 verdünnt)

Reduzierender Probenpuffer: 500 µl 10 M Harnstoff, 400 µl 10 % SDS, 200 µl nicht-reduzierender Probenpuffer, 200 µl β-Mercaptoethanol

Nicht-reduzierender Probenpuffer: 10 ml Lösung B (1:5 verdünnt), 1 ml Glycerol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Proteinstandard: Magic Marker der Firma Invitrogen, Karlsruhe; Proteine sind an den blauen Farbstoff Bromphenolblau gekoppelt (20-30-40-50-60-80-100-120 kDa)

2.4.12 Western Blot

Zur spezifischen Detektion mit entsprechenden Antikörpern erfolgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Nach Äquilibration der Nitrozellulosemembran in Transferpuffer wurde das Blot-Sandwich luftblasenfrei zusammengesetzt. Dabei liegt die Nitrozellulose auf der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite. Sowohl Gel als auch Nitrozellulosemembran werden sandwichartig von Filterpapieren (BioRad, München) eingerahmt. Diese Papiere dienen als Ionen- und Puffer-Reservoir bei der Elektrophorese. Die Blotapparatur Hoefer EPS 2A200 (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde mit Transferpuffer gefüllt und das Sandwich eingespannt. Das Blotten erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1000 mA und gekühltem Transferpuffer für ca. 1,5 Stunden. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran transferiert und gebunden werden. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus dem Protein-Detergenz-Komplex zu entfernen, und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran 1 - 5 Minuten mit Ponceau S-Lösung eingefärbt. Anschließend wurde die Ponceau S-Färbelösung mit Wasser

ausgewaschen, bis die Proteinbanden erkennbar waren. Die Nitrozellulosemembran konnte jetzt bei 4 °C gelagert werden.

Verwendete Materialien

Nitrozellulosemembran 45 µm, 9x12 cm der Firma BioRad, München

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol

Ponceau S-Lösung enthält 0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure der Firma Sigma, Taufkirchen

2.4.13 Detektion

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Nitrozellulose mit einem spezifischen Erstantikörper und mit einem für den Erstantikörper spezifischen Zweitantikörper inkubiert. An den zweiten Antikörper ist ein Enzym (Horseradish-peroxidase (HRP) = Meerrettich-Peroxidase) kovalent gebunden. Durch Inkubation mit Luminol-Reagenz kann dieses Enzym visualisiert werden (Immunblot). Dieses sehr sensitive Reagenz zeigt bei der katalytischen Umsetzung durch die Peroxidase eine Chemilumineszenz, durch die Röntgenfilme belichtet werden können. Eine hier verwendete so genannte ECL (enhanced chemiluminescence) – Detektion beruht auf dem Prinzip, dass ein Substrat (Luminol) durch HRP oxidiert und damit in einen angeregten Zustand überführt wird. Bei der Rückkehr in den Ausgangszustand wird Energie in Form von Licht frei, welches mittels eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Die Lichtemission wird durch die Anwesenheit von Enhancern (z.B. Phenolen) bei der Oxidation noch verstärkt. Die Lichtintensität ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Enzyms und damit zur spezifischen Proteinmenge, die auf der Membran gebunden ist.

Zuerst wurden die unspezifischen Bindungen mit einer Blockierlösung (Roche Applied Science, Mannheim; 5 g Blockierungsreagenz in 500 ml TBS-T beim Erwärmen und Rühren lösen) 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Membran wurde nun mit dem ersten Antikörper in Blockreagenz für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundenen und überschüssigen Antikörper zu entfernen. Nun folgte die Inkubation mit dem markierten Zweitantikörper in Blockreagenz für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubation wurde wie oben mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte dann mit dem ECL-System Plus (Amersham). Die Membran wurde dazu fünf Minuten inkubiert und die Signale mit einem ECL-Film in der Dunkelkammer mit geeigneter Belichtungszeit detektiert.

Verwendete Materialien:

1. AK LK-1 AntiHSP60, Stressgen, Konzentration: 1:2000
 2. AK sheep anti mouse, Invitrogen, Konzentration: 1:10000
- ECL-System Plus Substrat (Amersham)
ECL Röntgenfilme (Amersham)

2.4.14 Trauma-Modell bei der Maus

Zur Untersuchung der Wirkung eines lokalen Weichteiltraumas bei Mäusen wurde ein Traumamodell verwendet, bei dem ein geschlossenes Trauma ohne Fraktur erzeugt wird. Dieses Trauma musste dabei reproduzierbar und lokal begrenzt erzeugt werden. Das hier genutzte Modell stammt im Original von Crisco et al. [121] und wurde auf die Maus adaptiert und etabliert. Es wurden männliche BALB/c Mäuse und transgene HSP70 Mäuse zuerst durch Inhalationsnarkose mit Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und anschließend intramuskulär mit Xylazin/Ketamin (0,1 mg/g Gewicht Ketamin und 0,01 mg/g Körpergewicht Xylazin, CEVA, Sante Animale, Düsseldorf) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung narkotisiert. Die intramuskuläre Injektion erfolgte in einem Volumen von 50 μ l in den rechten Vorderlauf. Bei einer nicht ausreichend tiefen Narkose wurden bis zu 25 μ l nachinjiziert. Das Muskeltrauma wurde auf dem m. gastrocnemius je nach Versuchsaufbau ein- oder beidseitig durchgeführt. Zur Applikation des Traumas wurde bei der Maus ein 20 g schweres Gewicht, geführt innerhalb einer Plexiglasröhre, auf einen auf den Muskel aufgesetzten Stempel, im freien Fall aus 1,2 m appliziert. Auf diese Weise wurde ein reproduzierbares und lokal begrenztes Weichteiltrauma erzeugt (Abb. 3.1).

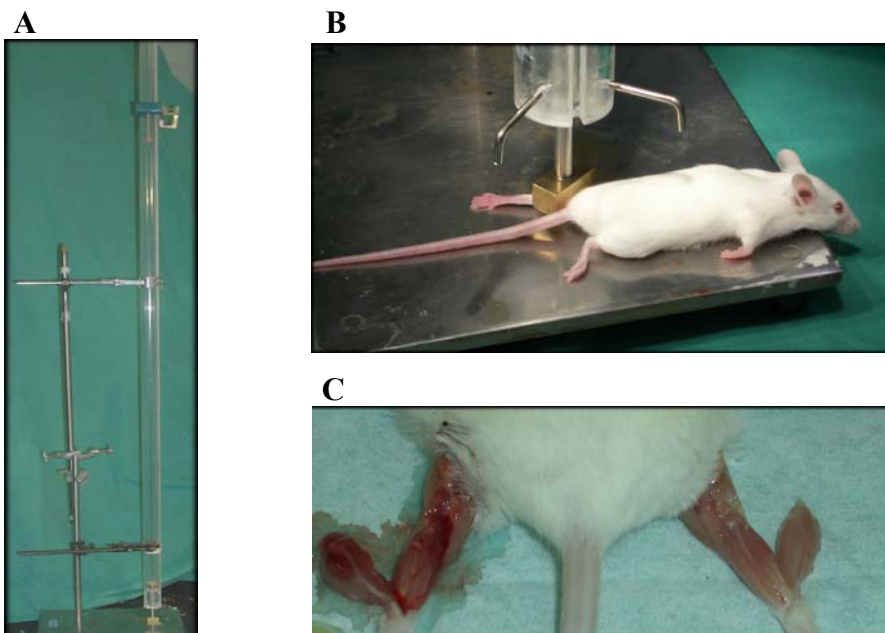


Abbildung 2.6: Applikation eines geschlossenen Weichteiltraumas. A: Röhre mit eingespanntem Gewicht (s. Pfeil) in 120 cm Höhe B: Versuchstier mit aufgesetztem Stempel zur Applikation des Traumas C: Maus in Bauchlage mit anpräparierten Muskeln. Deutlich ist der traumatisierte Muskel links im Vergleich mit dem nicht traumatisierten Muskel rechts erkennbar.

Als Negativkontrolle zu den traumatisierten Tieren wurden Versuchstiere wie oben beschrieben narkotisiert, aber kein Trauma induziert.

2.4.15 Isolation von Muskelzellen aus der Maus

Für die Isolation der Muskelzellen wurden die Muskeln nach Tötung der Tiere durch CO₂-Begasung und Genickbruch freipräpariert und in PBS überführt. Anschließend wurden die Muskeln mit einer Schere so klein wie möglich zerschnitten und für eine Stunde mit 1 ml Liberase Blendzyme 2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) (4 µg / ml) bei 37 °C verdaut. Nach dem Verdau wurden die Muskeln durch ein 40 µm Zellsieb gerieben und mit PBS gewaschen. Um den Debris zu begrenzen, wurde durch einen weiteren Filter mit Maschenstärke 30 µm (MACS Pre-Seperation Filter, Miltenyi Biotec) getropft.

Nach weiterem Waschen und Zentrifugation bei 460 g (1500 rpm) für 6 min und 4 °C wurde die Zellsuspension in geeigneter Menge PBS aufgenommen und für durchflusszytometrische Versuche verwendet.

2.4.16 Konfokale Laserscannmikroskopie

Bei der bereits 1955 von M. Minsky als Basis entwickelten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (engl: confocal laser scanning microscopy, CLSM) wird das Prinzip der konfokalen Mikroskopie und die enge Anregungswellenlänge eines Lasers genutzt.

Das Problem in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie besteht in der Differenz zwischen der rechnerisch möglichen und der wirklich erreichten Auflösung, da sich das Licht aus verschiedenen Ebenen des Präparates überlagert und zusätzliches Streulicht die Bildqualität verringert. In der konventionellen Mikroskopie wird die Fluoreszenz aller Objektebenen gemessen, wohingegen bei der konfokalen Mikroskopie nur die Strahlung einer Ebene erfasst wird und Strahlung aus anderen Ebenen durch das im Mikroskopaufbau enthaltene *pinhole* (konfokale Blende) ausgeschlossen wird. Dieses *pinhole*, dessen Durchmesser im Idealfall unendlich klein sein sollte, begrenzt, in welchem Maße Licht

außerhalb der fokussierten Ebene ausgeblendet wird. Es wird in einer Ebene angeordnet, in der sich die Strahlen, die vom Objektpunkt kommen, wieder schneiden, d.h. die zur Fokusebene konjugiert ist. Somit ist der besondere Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie, dass sie das von einer einzigen Ebene des Präparats reflektierte oder emittierte Licht erfasst. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) bietet zudem die Möglichkeit, durch Mehrfachfärbung mehrere Zielmoleküle parallel zu erfassen und sie durch Kanaltrennung auch getrennt darzustellen. Ein breites Spektrum an natürlichen und synthetischen Fluorochromen ermöglicht zudem die Identifizierung verschiedener Zellen und Zellkompartimente. Das konfokale Mikroskop setzt sich aus einem optischen Mikroskop, einem oder mehreren elektronischen Detektoren, einem Computer und verschiedenen Lasersystemen zusammen. Die Lasersysteme sind kombiniert mit Vorrichtungen zur Auswahl der Wellenlängen. Als Anregungsquelle dient ein Laserstrahl, der nach Passieren eines Monochromators durch Reflektion an einem galvanometrisch regulierten Dichromatspiegel in die gesuchte Ebene projiziert wird. Nach Anregung des Fluorochroms geht dessen emittierte Strahlung, die eine andere Wellenlänge besitzt als die Eingehende, durch den Dichromatspiegel und wird auf das *pinhole* fokussiert. Hinter der konfokalen Blende befindet sich der Detektor. Dieser besitzt eine photosensitive Oberfläche, welche die eingefangenen Photonen detektiert und die mittels PMT (Photomultiplier) in elektrische Signale weiterverarbeitet werden. Im Computer werden diese Signale dann wieder zu einem Bild zusammengesetzt.

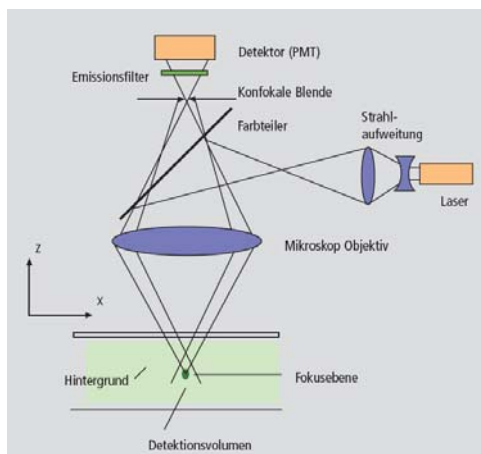


Abb. 2.7: Strahlengang in einem konfokalen LSM.

Ein Laserstrahl wird über ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert und dient dort z.B. zur Erzeugung von Fluoreszenzstrahlung. Diese wird über das Objektiv gesammelt und über einen Farbteller effizient zum Detektor weitergeleitet. Über einen Emissionsfilter wird der interessierende Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums selektiert und zusätzlich die zur Anregung verwendete Laserlinie abgeblockt. Vor dem Detektor befindet sich die konfokale Blende. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene trifft defokussiert auf die Blende und trägt nicht zur Bildentstehung bei. (nach Zeiss, Oberkochen)

Die vollständige Generierung der zweidimensionalen Objektinformation aus der Fokusebene (Objektebene) eines konfokalen LSM umfasst im Wesentlichen drei Verarbeitungsschritte:

1. Zeilenweises Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl, der mittels zweier galvanometrisch betriebener Scanner in x- und y-Richtung abgelenkt wird.
2. Pixelweise Detektion der vom jeweils abgetasteten und am Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung über einen Sekundärelektronen-Vervielfacher (PMT).
3. Digitalisierung der nach dem PMT als elektrisches Signal vorliegenden Objektinformation. (Die Darstellung auf dem Bildschirm erfolgt durch pixelweises Ausgeben der Bilddaten aus einem digitalen Bildspeicher).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Messungen am Laser-Scanning-Mikroskop (Typ Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm (grün), 364 nm (blau) und 543 nm (rot) durch einen Argon- und einen Enterprise-Laser.

2.4.17 Immunfluoreszenz für LSM

Probengewinnung:

Die traumatisierten oder Kontrollmuskeln wurden aus der Maus entnommen und direkt in vorgekühltem Isopentan eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden danach in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gesammelt. Die anschließende Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Vor dem Schneiden wurden die Proben ca. 2 Stunden im Kryostaten (-21 °C) temperiert. Das Aufblocken erfolgte mit Neg -50 Medium (Richard-Allan Scientific, Michigan, USA) und es wurden 7 µm starke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden eine Stunde an der Luft getrocknet und 10 Minuten in 96 %-igem Ethanol fixiert. Erfolgte die Färbung nicht direkt, wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung für LSM

Die Antikörperfärbungen und Inkubationen für die LSM Aufnahmen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Nach dem Spülen der Schnitte wurden unspezifische Bindungen mit Blockierpuffer (1 % BSA in PBS mit 10 % Maus-IgG) über Nacht bei 4 °C blockiert. Danach erfolgte die Färbung nach folgendem Schema.

Tabelle 2.2: Tabellarische Darstellung des Färbe-Protokolls für LSM Aufnahmen.		
1. Antikörper	90 min	a) Gr-1 1:200 b) F4/80 1:500 c) CD11c 1: 50
PBS	2x Spülen + 2x5min	
2. Antikörper	45 min	a) IgG2b FITC 1:2000 b) IgG2a FITC 1: 500 c) Streptavidin FITC 1: 200
PBS	2x Spülen +2x5min	
Rattenserum	60 min	
PBS	2x Spülen +2x5min	
FAB (10-20 mg/ml) 1:50	60 min	nicht bei CD11c
PBS	2x Spülen +2x5min	
Laminin 1:400	90 min	
PBS	2x Spülen +2x5min	
Cy 3 1:200	45 min	
PBS	2x Spülen +2x5min	
<i>Vectorshield</i> mit DAPI		
<ul style="list-style-type: none"> ○ ca. 20 µl für 18x18 Deckgläser ○ mit Nagellack umschließen, um Eintrocknen zu verhindern 		

Die fertigen Präparate wurden im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Verwendete Materialien:

Antikörper:

Vectorshield Vectashield Mounting Medium with DAPI Vector Laboratories, Burlingame Kalifornien
 Goat anti Rat IgG2a (F4/80) Antikörper FITC markiert, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas 1mg/ml
 Biotin Hamster Anti-Maus CD11c, BD Bioscience 0,5 mg/ml
 Goat Anti Rat IgG2b (GR-1) Antikörper FITC markiert, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas 1mg/ml
 Rat IgG1 Anti Laminin-2 (α -2-chain) (clone 4H8-2) Alexis Biochemicals, Lörrach, Germany
 Rat Anti-Maus GR-1 FITC (clone RB6-8C5), ImmunoTools, Friesoythe, Germany
 Pure Fab Fragment Goat Anti-Rat IgG 1,2 mg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania
 Rat Anti-Maus F4/80 (clone BM8) Antikörper, Acris Antibodies, Hiddenhausen
 Rat IgG 1 purified, BD Bioscience
 Hamster Anti-Maus CD 11c (biotinyliert) BD Pharmingen
 Fluorescein Streptavidin, Vector Laboratories

2.4.18 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaktion, PCR) besteht aus sich wiederholenden Zyklen mit jeweils drei Teilschritten: der Trennung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung), dem Anlagern der Primer (Annealing) und der Komplettierung der Tochterstränge (Polymerisation). Die eingesetzte DNA-Polymerase wird aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermophilus aquaticus* [122] isoliert. Dieser wächst in 70 °C heißen Quellen und denaturiert somit bei den sich wiederholenden Heizschritten der PCR nicht. Zwei DNA-Oligonukleotide werden auf chemischem Wege synthetisiert und dienen anschließend als Primer für die Synthese einzelsträngiger DNA, wo sie am 5'-Ende als Teil des neuen Stranges verbleiben. Die neuen DNA-Stränge werden nun in einer *in vitro* katalysierten Reaktion mithilfe der DNA-Polymerase dargestellt. Die Taq-DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität sowie eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, jedoch keine Exonukleaseaktivität für die entgegengesetzte Richtung, welche eine Korrekturaktivität (proofreading) erlaubt. Die hier verwendete Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) ist ein rekombinantes Enzym aus *Escheria coli*. Im ersten Schritt wurden die Proben mit doppelsträngigen cDNA-Molekülen auf 94 °C erhitzt. Dadurch wurden die Bindungen zwischen den Basenpaaren gelöst, so dass einzelsträngige DNA-Moleküle vorlagen. Damit die Taq-Polymerase ihre Arbeit beginnen konnte, wurden im zweiten Schritt bei 50 – 70 °C die Startstücke (Primer) angelagert. Annealing-Temperatur (TM) und Zyklenzahl wurden für den jeweiligen Primer optimiert. Im dritten Schritt (Elongation), fügte die Taq-Polymerase bei 72 °C beginnend am jeweiligen 3'-Ende der Primer nun jeweils die zur Vorlage komplementären Bausteine hinzu. Auf beiden Molekülhälften der ursprünglichen Doppelhelix wurde so der gleiche Abschnitt zum Doppelstrang aufgefüllt. Die neu gebildeten DNA-Abschnitte lieferten nach erneuter Denaturierung im darauf folgenden Zyklus die Vorlagen für die Synthese neuer Stränge. Am Ende der Kettenreaktion lag die gesuchte Sequenz in Vielfachkopie vor. Das Syntheseprodukt wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Für die PCR-Analysen wurde die Taq-DNA-Polymerase der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Die 25 µL Reaktionsansätze wurden in 0,2 mL 8er-Streifenreaktionsgefäßen auf Eis zusammenpipettiert: 2,5 µL Template (cDNA aus RT-Reaktion); 0,5 µL Primer-Sense (20 µM); 0,5 µL Primer-Antisense (20 µM); 0,5 mL dNTPs (10 mM); 2,5 µL 10 xTaq Buffer_{advanced}; 0,25 µL Taq-DNA-Polymerase (5 U µL⁻¹); entsprechende Menge H₂O.

Die Reaktionen wurden in dem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) als „touch-down“ PCR mit dem für die jeweiligen Primer optimierten

Amplifizierungsprotokoll durchgeführt. Es wurde für alle Primer das Standardprotokoll: 94 °C für 2 min; 30-35 x (94 °C für 30 sec; 65 °C für 30 sec; 72 °C für 30 sec); 72 °C für 10 min verwendet.

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen von Primern, Nukleotiden bzw. Polymerase wurde nach Ablauf der PCR ein weiterer Schritt angeschlossen, indem im letzten Zyklus eine Kühlung des PCR-Ansatzes auf 4 °C durchgeführt wurde.

Verwendete Materialien:

Taq-DNA-Polymerase Kit der Firma Eppendorf, Hamburg
Desoxyribonukleotide (dNTPs) der Firma Invitrogen, Karlsruhe; 100 mM wurden zu einer Konzentration von 10 mM mit RNase freiem Wasser verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert
RNase freies Wasser der Firma Qiagen, Hilden
Oligonukleotide (Primer) der Firma Operon (Köln)

Die Primer wurden in 10 mM Tris-HCl bis zu einer Konzentration von 100 µM (100 pmol µL⁻¹) gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die PCR wurden die Primer zu einer Konzentration von 20 µM mit 10 mM Tris-HCl-Pufferlösung pH 6,8 verdünnt.

Primer

KC Forw.: CGG AAT TCG CCA CCA GCC GCC TG
KC Rev.: CGT CTA GAC TTT CTC CGT TAC TTG G
MIP-1 α Sense: GAA GAG TCC CTC GAT GTG GCT A
MIP 1- α antisense: CCC TTT TCT GTT CTG CTG ACA AG
MCP-1 Sense: GGA AAA ATG GAT CCA CAC CTT GC
MCP-1 Antisense: TCT CTT CCT CCA CCA CCA TGC AG
HPRT Forw. GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G
HPRT REV.: GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT
MIP-2 Sense: TGG GTG GGA TGT AGC TAG TTC C
MIP-2 Antisense: AGT TTG CCT TGA CCC TGA AGC C
SDF-1 Sense: GGA CGC CAA GGT CGT CGC CGT G
SDF-1 Antisense: TTG CAT CTC CCA CGG ATG TCA G

Typisierung der transgenen Tiere

Der verwendete transgene Mausstamm HSP70 wurde aus dem CB6F1 CMVIE Stamm von W.H.Dillmann auf BALB/c Hintergrund zurückgezüchtet (Abs. 2.2). Dabei musste bei jedem Tier überprüft werden, ob es das Transgen trägt, oder ob es sich um eine Wildtyp (WT) Maus handelt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere im Alter von vier Wochen mithilfe einer Ohrmarkierung und einer Käfignummer katalogisiert. Mittels Lochzange entnommene Stanzen aus dem Ohr wurden in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Es folgte eine Übernacht-Inkubation bei 60 °C und anschließend eine Inaktivierung der enthaltenen Proteinase K durch 15-minütiges Erhitzen auf 95 °C. Anschließend wurden die Proben gekühlt und in der PCR als Template verwendet.

Verwendete Materialien:

Lysepuffer:
1 fach PCR Puffer mit 0,045 % Tween 20, 0,045 % NP-40, 0,5 mM MgCL₂ und 50 µg/ml Proteinase K

Material und Methoden

verwendete Primer:

CMVIE71:

ATT ACG GGG GTC ATT AGT TCA TAG CC

CMVIE351:

GTA GGA AAG TCC CAT AAG GTC ATG T

Verwendetes PCR Programm:

94 °C 2 min

30 Wiederholungen:

94 °C 30 s

70 °C 30 s

72 °C 45 s

72 °C 5 min

Kühlung auf 4 °C

3. Ergebnisse

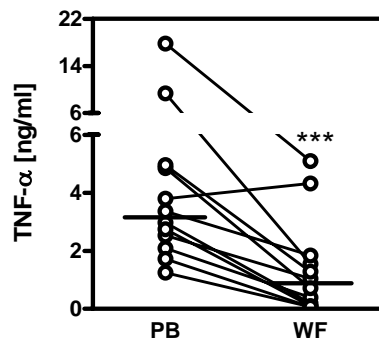
3.1 Die Auswirkung eines Weichteiltraumas auf das Immunsystem

3.1.1 Stimulierbarkeit der Zellen aus Wundflüssigkeit und peripherem Blut

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit ein Weichteiltrauma die Immunantwort modulieren könnte. Dazu wurden als Modell selektiv standardisierte Operationen an Patienten ausgewählt. In der ersten Phase wurden sowohl kleinere Operationen mit geringem Weichteilschaden wie auch polytraumatisierte Patienten untersucht. Für die immunologische Betrachtung eines großen Weichteiltraumas innerhalb dieses ersten Abschnitts wurden daraufhin Totale Endoprothesen (TEP) und Hüftoperationen ausgewählt, da sie einen großen Weichteilschaden innerhalb einer standardisierten Operation aufweisen, ohne weitere Faktoren wie Ischämie und Reperfusionsschäden oder Kopfverletzungen, wie es beim Polytrauma häufig der Fall ist.

Um die direkte Wirkung des Weichteiltraumas auf die Immunantwort zu untersuchen, wurden die Mononukleären Zellen (MNC) der Wundflüssigkeit (Drainageflüssigkeit aus der operativen Wunde), repräsentativ für die Immunantwort am Ort des Traumas, mit denen aus dem peripheren Blut, repräsentativ für die systemische Immunantwort, in ihrer Reaktion auf LPS verglichen. Die MNC aus der Drainageflüssigkeit (WF) und dem peripherem Blut (PB) (siehe Material Methoden 2.4.1) wurden dazu drei und sechs Stunden nach Operationsende (Nahtschluss) aufgereinigt und mit LPS (Endotoxin) stimuliert. Dabei wurde die Menge des produzierten TNF- α im Überstand, nach einer 24 stündigen Inkubation mit LPS mittels ELISA bestimmt. Unstimulierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle und zeigten dabei keinerlei TNF- α Sekretion.

A



B

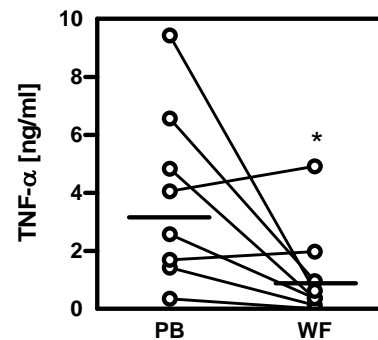


Abb. 3-1: Stimulation von MNC aus Wundflüssigkeit und peripherem Blut

Die MNC aus Blut und Wundflüssigkeit wurden mittels Ficoll isoliert und für 24 Stunden mit 1 ng/ml LPS in autologem Medium stimuliert. Die Menge an TNF- α wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Wundflüssigkeit (WF) und das korrespondierende periphere Blut (PB) des jeweiligen Patienten wurden mit Linien verbunden, während die horizontalen Linien den Median anzeigen. A: WF 3 Std. B: 6 Std. nach Operationsende. Dargestellt ist eine Gruppe aus 11 Patienten für beide Zeitpunkte. Wilcoxon signed rank Test. *** $p < 0,001$ * $p < 0,05$ zwischen PB und WF.

In diesem Versuch wurde ein deutlicher Unterschied in der Stimulierbarkeit der MNC zwischen dem peripheren Blut und der Wundflüssigkeit beobachtet. Bei der Betrachtung der Mediane zeigte sich eine signifikante Reduktion der LPS-induzierten TNF- α Sekretion der MNC der Wundflüssigkeit (A: 875 pg/ml; B: 493 pg/ml) im Vergleich zu den korrespondierenden MNC des peripheren Blutes (A: 3169 pg/ml; B: 3312 pg/ml). Dieser Effekt bestand sowohl drei Stunden wie auch sechs Stunden nach der Operation.

Da als Hauptproduzenten von TNF- α unter den MNC im peripheren Blut die Monozyten angenommen werden, wurde überprüft, ob die verringerte Ausschüttung von TNF- α an einer veränderten Stimulierbarkeit der Monozyten liegt. Dazu wurden die MNC aus dem Blut und der Wundflüssigkeit mit und ohne LPS stimuliert und für mehrere Stunden mit Golgi-Stop inkubiert. Die Monozyten wurden mit anti-CD14 Antikörpern markiert und das TNF- α intrazellulär nachgewiesen. Der Nachweis der TNF- α Produktion der MNC erfolgte im Durchflusszytometer. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die CD14 positiven Monozyten gelegt und dort die Menge an TNF- α in der Zelle bestimmt. Zum Vergleich wurden in Medium kultivierte Zellen benutzt, welche kaum TNF- α positive Monozyten aufwiesen. Wurden die Zellen hingegen mit LPS stimuliert, zeigte sich eine große Anzahl TNF- α positiver Monozyten (CD14 positiv und TNF- α positiv) im peripheren Blut und eine deutlich geringere Anzahl bei den Monozyten aus der WF.

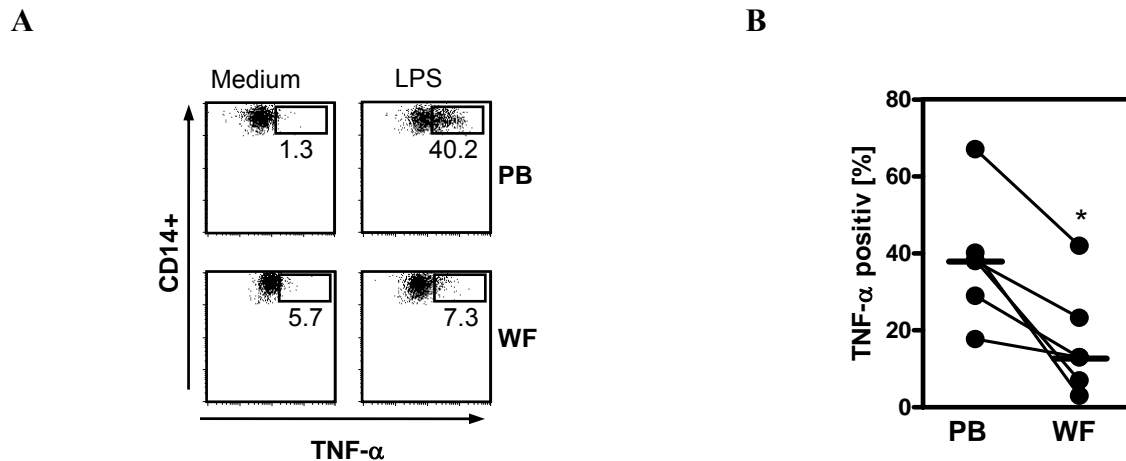


Abb. 3-2 Stimulierbarkeit von Monozyten aus Wundflüssigkeit (WF) und peripherem Blut (PB).

A: MNC Zellen aus der WF und dem korrespondierenden PB desselben Patienten wurden isoliert, mit LPS (1 ng/ml) stimuliert und mit Golgi-Stop inkubiert. Anschließend wurde mit anti-CD14 eine Oberflächenfärbung und mit anti-TNF- α eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse des Durchflusszytometers sind im Dotplot eines repräsentativen Ergebnisses dargestellt. Die doppelt positiven Zellen sind innerhalb des Gates lokalisiert und die Prozentangabe zeigt die Menge an TNF- α positiven Zellen an.

B: Prozentuale Verteilung der TNF- α positiven Monozyten

In Abb. B sind die TNF- α positiven Monozyten von sechs unterschiedlichen Probanden in PB und WF aufgetragen und mit Linien verbunden. Die horizontalen Linien zeigen den Median an. Wilcoxon signed rank test. * $p < 0.05$. PB gegen WF

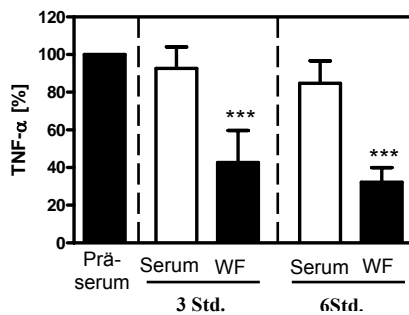
Im Dotplot (Abb. 3-2 B) waren nur 7,3 % (Median 13 % Abb. 3-2 B) der MNC aus der Wundflüssigkeit nach LPS Stimulation TNF- α positiv, während 40 % (Median 38 % Abb. 3-2 B) der Monozyten aus dem Blut für TNF- α positiv waren. Dies zeigt eine deutlich verringerte Fähigkeit der Monozyten aus der Wundflüssigkeit auf einen Stimulus durch LPS mit der Ausschüttung von TNF- α zu reagieren. Dieses Ergebnis korreliert dabei mit der in Abb. 3-1 dargestellten verringerten Reaktion der MNC auf den Stimulus. Insgesamt ergab sich eine signifikante Verringerung der Stimulierbarkeit um den Faktor drei bei den Monozyten. Innerhalb von drei Stunden nach Operation kommt es am Ort der Gewebeschädigung zu einer Hemmung der Fähigkeit von MNC, insbesondere der Monozyten, zur LPS-induzierten TNF- α Freisetzung.

3.1.2 Inhibitorische Wirkung der Wundflüssigkeit

Da die Zellen in der Wundflüssigkeit nach Stimulation mit LPS nur geringe Mengen an TNF- α produzieren können, stellte sich die Frage, inwieweit die Wundflüssigkeit selbst diese Inhibition vermittelte. Um diese Annahme zu testen, wurden PBMNC von gesunden Probanden in Gegenwart von Serum, beziehungsweise Wundflüssigkeit der Patienten, mit LPS stimuliert und die Menge an TNF- α und IL-10 im Überstand bestimmt (Abb. 3-3). Dazu

wurden die MNC gesunder Spender in Medium mit autologem Serum kultiviert und mit 5 % (Vol/Vol) Serum oder Wundflüssigkeit (drei und sechs Stunden nach Operation) inkubiert und zeitgleich für 24 Stunden mit LPS (1 ng/ml) stimuliert. Die Inkubation mit Serum sollte dabei zeigen, ob ein systemisch ausgeschütteter Faktor eine Rolle spielt. Da MNC durch fremdes Serum in geringem Maße stimuliert werden, diente ein Prä-Serum, das dem Patienten kurz vor der Operation abgenommen worden war, als Negativ-Kontrolle. Der Wert dieser Negativ-Kontrolle wurde jeweils als 100 % definiert und alle Ergebnisse des jeweiligen Patienten auf diesen Wert normiert. Auf diese Weise wurden die Variationen verschiedener Experimente kompensiert.

A



B

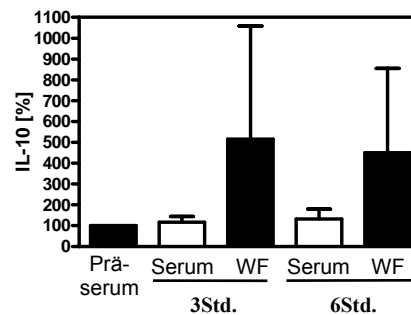


Abb.3-3: Modulation des LPS Stimulus auf gesunden PBMNC durch Wundflüssigkeit.

Mononukleäre Zellen gesunder Probanden wurden mit 5 % (Vol/Vol) Wundflüssigkeit oder Serum und LPS (1 ng/ml) für 24 Std. stimuliert und danach TNF- α (A) und IL-10 (B) mittels ELISA im Überstand bestimmt. Für beide Graphen wurden dieselben sechs Patienten untersucht und auf das korrespondierende Prä-Serum bezogen. ANOVA and Newman-Keuls Post-test. *** $p < 0.001$.

Es zeigte sich bei diesen Experimenten eine signifikante inhibierende Wirkung der Wundflüssigkeit auf die TNF- α Produktion. Die Gegenwart von Wundflüssigkeit während der Stimulation mit LPS reduzierte die Menge an ausgeschüttetem TNF- α auf 43 % bzw. 32 % der Prä-Serumkontrolle. Die Inkubation mit post-operativ abgenommenem Serum ergab dabei keine Änderung der Stimulierbarkeit der MNC. Die Absolutwerte der als 100% normierten Kontrollen (Prä-Serum) betragen für TNF- α $4,4 \pm 1,7$ ng/ml und bei IL-10 154 ± 105 pg/ml (jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung). Im Gegensatz zur TNF- α Hemmung (Abb 3-3 A) zeigte sich bei IL-10 (Abb. 3-3 B) eher eine Erhöhung der Sekretion durch die Wundflüssigkeit. Dieses Ergebnis zeigt, dass es in der Wundflüssigkeit, aber nicht im Serum einen Faktor gibt, welcher die TNF- α Produktion inhibiert. Die Erhöhung bei IL-10 war nicht signifikant und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

3.1.3. Veränderung der Zellzusammensetzung in der Wundflüssigkeit im Vergleich zum Blut

Parallel zur Deaktivierung von Monozyten kommt es nach Trauma zu einer Veränderung der zellulären Homeostase im Blut und dem geschädigten Gewebe. Um den Einfluss des Weichteiltraumas auf die Homeostase zu untersuchen, wurden von jedem Patienten Blutproben vor (Prä-Blut) und nach der Operation mit der Wundflüssigkeit desselben Zeitpunktes verglichen. Es wurden die Anteile an Monozyten, Granulozyten, Leukozyten und T-Lymphozyten durchflusszytometrisch analysiert und in ihrer Zellzusammensetzung verglichen.

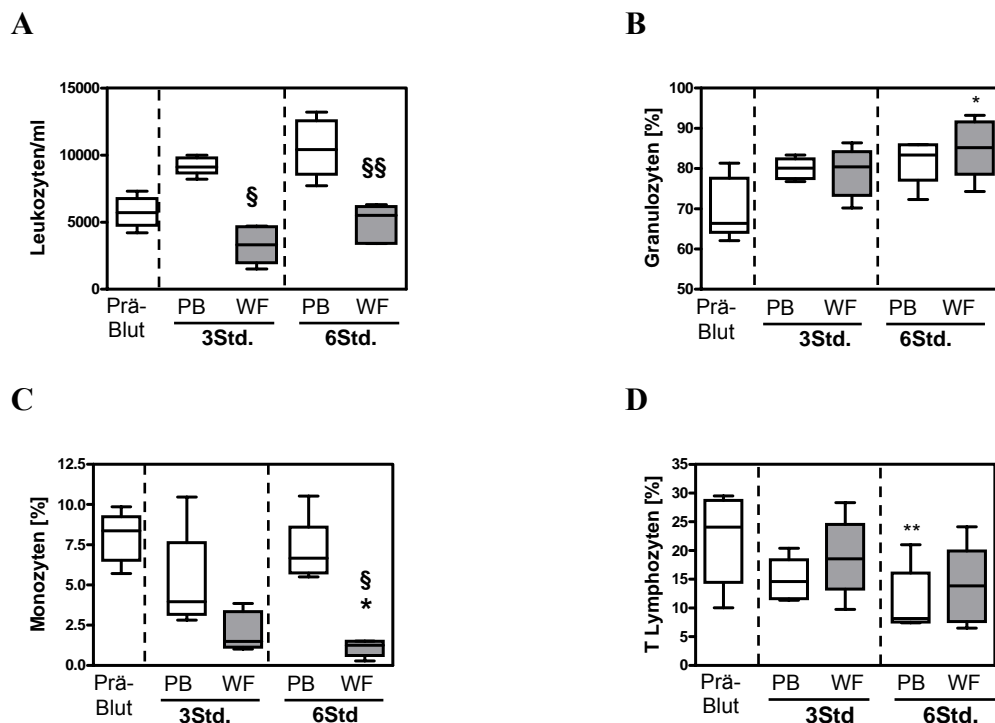


Abb. 3-4 : Zelluläre Zusammensetzungen des peripheren Blutes und der Wundflüssigkeit.

Peripheres Blut vor der Operation (Prä-Blut) und 3 bzw. 6 Stunden nach der Operation und korrespondierende Wundflüssigkeit wurden mit Antikörpern gegen CD14, CD3 und CD45 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Darstellung umfasst dabei die Gesamtzahl der Leukozyten pro Mikroliter (A), der prozentuale Anteil an Granulozyten (B), Monozyten (C) und T-Lymphozyten (D). Es wurden dazu die in Abb. 3.1 untersuchten Patienten dargestellt.

A-D zeigen Boxplots (Mediane, 25 % und 75 % Percentile mit den Minimal- und Maximal-Werten als Fehlerbalken) der jeweiligen Zellpopulationen. Die Unterschiede der Gruppen wurden mit dem Friedman und Dunn Test ausgewertet. Peripheres Blut gegen Wundflüssigkeit: § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$; Prä-Blut gegen Wundflüssigkeit oder peripheres Blut * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Beim Vergleich der Anzahl der Leukozyten im Blut vor (Prä-Blut) und nach der Operation zeigte sich, dass die Anzahl der Leukozyten im Blut drei und sechs Stunden nach der Operation erhöht war. Die Wundflüssigkeit enthielt insgesamt weniger Leukozyten als das Blut (Abb. 3-4 A). Der Anteil der Granulozyten in den Gesamt-Leukozyten stieg dabei

sowohl im Blut, als auch in der Wundflüssigkeit im Vergleich zum Prä-Blut an (Abb. 3-4 B). Der Anteil der Monozyten blieb im Blut relativ konstant, zeigte allerdings eine signifikante Reduktion bei der Wundflüssigkeit sechs Stunden nach der Operation. Diese Reduktion war nicht nur im Vergleich zum Prä-Blut sichtbar, sondern auch zum zeitgleich abgenommen peripheren Blut signifikant nachweisbar (Abb. 3-4 C). Die Anzahl der T-Lymphozyten unterschied sich zwischen dem peripheren Blut und der Wundflüssigkeit nicht deutlich, allerdings war eine signifikante Abnahme nach sechs Stunden zwischen dem Prä-Blut und dem peripheren Blut zu sehen.

Zusammenfassend war eine deutliche Zunahme des Anteils an Granulozyten im peripheren Blut und der Wundflüssigkeit nach der Operation zu sehen, während die Menge der Monozyten in der Wundflüssigkeit deutlich abnahm. Die Zellzusammensetzung wurde also durch das Trauma sowohl systemisch (peripheres Blut), als auch lokal (Wundflüssigkeit) verändert.

3.1.4 Induktion der Chemokin-Produktion durch Wundflüssigkeit

Wie oben gezeigt moduliert die Wundflüssigkeit die Zytokin Antwort von MNC auf einen LPS Stimulus. Des Weiteren veränderte sich die Zellzusammensetzung im Blut und der Wundflüssigkeit nach der Operation. Dabei nahm die Leukozytenanzahl im Blut nach der Operation deutlich zu, welches ein Hinweis auf die Gegenwart von Chemokinen sein könnte. Dabei waren vor allem die Erhöhung der Granulozytenanzahl in Blut und Wundflüssigkeit und die Verringerung der Monozytenanzahl in der Wundflüssigkeit signifikant. Aus diesem Grund wurde das für Granulozyten chemoattraktiv wirkende Chemokin IL-8 in der Wundflüssigkeit bestimmt und in einer Konzentration von 5,9 [1,2-23] ng/ml (Median [Range]), allerdings nicht im Serum (unterhalb der Nachweisgrenze von 300 pg/ml), nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob die Produktion von Chemokinen auf stimulierende Faktoren in der Wundflüssigkeit zurückzuführen ist, wurden PBMNC von gesunden Probanden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wundflüssigkeit beziehungsweise mit dem korrespondierenden Serum kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Konzentration der Chemokine IL-8, MCP-1 und RANTES im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt und auf die jeweilige Serumkontrolle bezogen.

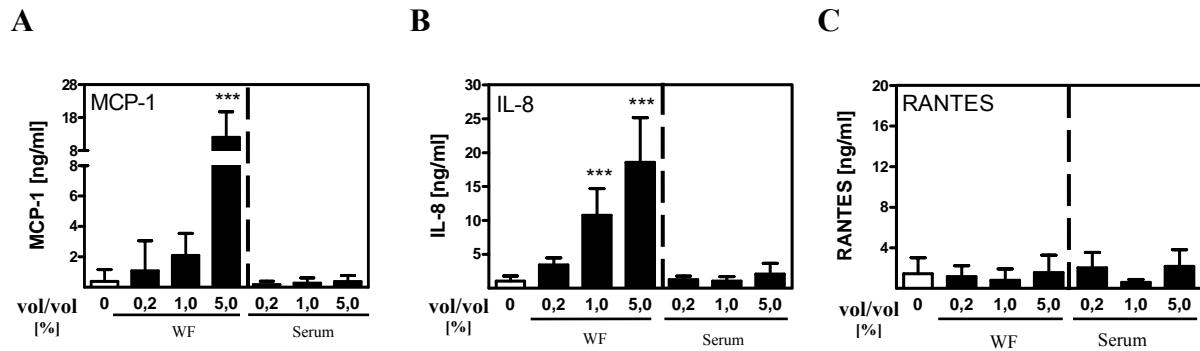


Abb. 3-5 Induktion von Chemokinen durch Wundflüssigkeit

PBMNC von gesunden Probanden wurden mit unterschiedlichen Mengen an Wundflüssigkeit (Drei Stunden nach Operationsende) und korrespondierendem Serum für 48 Stunden inkubiert und die Produktion von MCP-1 (A), IL-8 (B) und RANTES (C) im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 Patienten in Mittelwert und Standardabweichung. Dieselben Konzentrationen an WF und Serum wurden verglichen und mit ANOVA and Newman-Keuls Post-test *** $p < 0.001$ ausgewertet.

In Abbildung 3-5 ergaben sich ohne Zugabe von Wundflüssigkeit oder Serum Werte von maximal 1,5 ng/ml bei allen drei getesteten Chemokinen. Die Wundflüssigkeit zeigte bei 1 % und 5 % eine Induktion der IL-8 Produktion von bis zu 18 ng/ml (Abb. 3-5 B). Dieselbe Menge an korrespondierendem Serum führte zu keiner IL-8 Produktion durch die MNC.

Für MCP-1 wurde ebenfalls eine durch die Wundflüssigkeit vermittelte signifikante Erhöhung der Sekretion gefunden (Abb. 3-5 A). Bei einer Konzentration der Wundflüssigkeit von 0,2 % ergab sich eine leichte Zunahme, während die Verwendung von 1 % und 5 % der Wundflüssigkeit über 11 ng/ml MCP-1 im Überstand ergaben. Die Zugabe von Serum ergab auch hier keine Induktion von MCP-1. Im Gegensatz dazu wurde, weder durch Wundflüssigkeit, noch durch das korrespondierende Serum, RANTES induziert (Abb. 3-5 C). Diese Daten zeigen, dass lokal am Ort der Gewebeschädigung Faktoren freigesetzt werden, welche die Synthese bestimmter Chemokine durch MNC induzieren.

3.1.5 Der stimulierende Faktor in der Wundflüssigkeit ist ein Protein

Zur weiteren Charakterisierung der immunmodulatorischen Wirkung der Wundflüssigkeit wurde überprüft, ob es sich bei dem stimulierenden Effekt in der Wundflüssigkeit um Proteine handelte. Wundflüssigkeit wurde mit Proteinase K gekoppelter Agarose inkubiert und dadurch die Proteine in der Wundflüssigkeit zerstört. Serumfreies Medium, welches dieselbe Behandlung durchlief, fungierte dabei als Negativ-Kontrolle. Um Effekte durch die Agarose selbst auszuschließen, wurden zum Vergleich Wundflüssigkeit und Medium mit ungekoppelter Agarose behandelt. Unbehandelte Wundflüssigkeit wurde als Positiv-Kontrolle

verwendet. PBMNC gesunder Probanden wurden mit den beschriebenen Stimuli für 48 Stunden inkubiert und die Menge an IL-8 im Überstand mittels ELISA bestimmt.

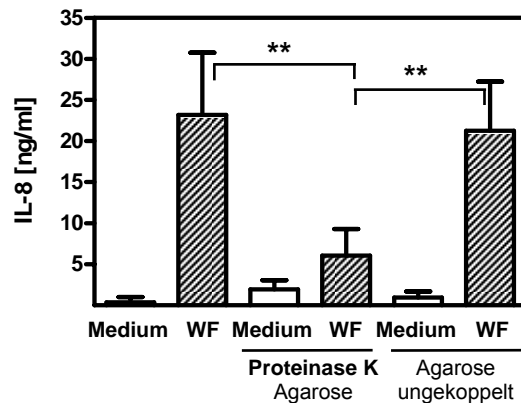


Abb. 3-6: Der stimulierende Faktor in der Wundflüssigkeit ist Proteinase K sensitiv.

Gesunde PBMNC wurden mit WF und Medium inkubiert, welche vorher mit Proteinase K gekoppelter Agarose oder ungekoppelter Agarose behandelt worden waren. Unbehandeltes Medium und Wundflüssigkeit fungierten dabei als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle. Nach 48 Stunden wurde IL-8 im Überstand mittels ELISA bestimmt und mit ANOVA und Newman-Keuls Post-test geprüft. ** $P < 0.01$ Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Patienten.

Abbildung 3-6 zeigte, dass Medium alleine oder nach Vorbehandlung mit Agarose keine IL-8-Synthese durch PBMNC induzierte. Die unbehandelte Wundflüssigkeit hingegen induzierte große Mengen an IL-8 aus PBMNC (Mittelwert \pm SD 23.2 ± 7.6 ng/ml), ebenso wie die nur mit Agarose behandelte Wundflüssigkeit (Mittelwert \pm SD 21.3 ± 6.0 ng/ml). Im Gegensatz dazu zeigte die Wundflüssigkeit, welche mit Proteinase K behandelt wurde, eine deutliche Reduktion in der IL-8 Produktion (Mittelwert \pm SD 6.0 ± 3.2 ng/mL). Dem zufolge beruht ein Großteil der durch die Wundflüssigkeit vermittelten Stimulation von MNC zur IL-8 Synthese auf einem oder mehreren Proteinen.

3.1.6 Die Wundflüssigkeit enthält intrazelluläre Bestandteile von Muskelzellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass es sich bei der Stimulation durch die Wundflüssigkeit um einen proteinvermittelten Effekt handelte, wurden intrazelluläre Proteine ausgewählt und auf ihre Gegenwart in Serum und Wundflüssigkeit überprüft. Zuerst wurden drei intrazelluläre Proteine ausgewählt, um die Größe des Traumas abzuschätzen. Zur Abschätzung der Muskelschädigung wurde Creatin Kinase (CK) bestimmt. Dabei gilt als Normalbereich ein Wert < 190 U/l. Als weiterer Parameter der Muskelschädigung wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) mit einer physiologischen Bandbreite von bis zu 240 U/l

untersucht. Um zu bestimmen, inwieweit Blut in der Wundflüssigkeit und dem Serum enthalten war, wurde freies Hämoglobin bestimmt. Dabei gilt ein Wert nicht über 60 mg/l als physiologisch [123].

	Serum Median (3 Std.) (25 % Perzentil ; 75 % Perzentil)	Wundflüssigkeit Median (3 Std.) (25 % Perzentil ; 75 % Perzentil)
CK [U/ml]	23 (21,75 ; 23,25)	61965 (19788 ; 98583)
LDH [U/ml]	15,5 (15 ; 27)	4221 (2601 ; 6468)
Freies Hb [mg/ml]	82,7 (38,63 ; 96,7)	4800 (2150 ; 7680)
Angegeben sind die Mediane und Perzentil von elf unterschiedlichen Patienten drei Stunden nach Operationsende.		

Es zeigte sich dabei, dass eine große Menge intrazellulärer Bestandteile, welche auf eine ausgedehnte Skelettmuskelschädigung hinweisen, in der Wundflüssigkeit aber nicht im Serum vorhanden waren. Nur das freie Hämoglobin war dabei im Serum über den Normalbereich erhöht. In Tabelle 3-2 wurden zusätzlich Myoglobin, welches ausschließlich in der Skelett- und Herzmuskulatur von Säugetieren in einem Normalbereich von 35 µg/l bis 55 µg/l vorkommt, sowie die Gesamtproteinmenge und der Gehalt an HSP60 und HSP70 bestimmt. Als Vergleich wurde das korrespondierende Serum mit denselben Parametern untersucht.

	Serum Median (25% Perzentil, 75% Perzentil)		Wundflüssigkeit Median (25% Perzentil, 75% Perzentil)	
	3Std.	6Std.	3Std.	6Std.
Protein, mg/mL (n = 6)	73.4 (56.4, 94.0)	67.3 (54.8, 86.7)	76.8 (70.2, 92.6)	56.2 (52.4, 71.1)
Myoglobin, µg/mL (n = 13 [3Std.];n=7 [6Std.])	0.1 (0.0, 5.2)	4.3 (0.1, 5.0)	35.9 (26.6, 125.0)***	60.8 (30.4, 237.2)*
HSP70, ng/mL (n = 9)	< 0.78	< 0.78	296 (165, 452)**	334 (174, 519)**
HSP60, ng/mL (n = 13)	< 20	< 20	140 (93, 173)***	102 (59, 143)**
Serum und Wundflüssigkeit wurden auf ihren Gehalt an Gesamtprotein, Myoglobin und HSP60 bzw. HSP70 untersucht. Es sind die Mediane und Perzentil der indizierten Anzahl an Patienten aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen Serum und Wundflüssigkeit eines Zeitpunktes wurden mit Wilcoxon signed rank test bestimmt. *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05				

Sowohl für Myoglobin, als auch für beide HSP Formen ergaben sich höhere Mengen in der Wundflüssigkeit im Vergleich zum Serum. Die Menge an Gesamtprotein unterschied sich nicht zwischen Serum und Wundflüssigkeit. Das HSP70 wurde dabei mittels ELISA bestimmt, während der Gehalt an HSP60 mittels Immunpräzipitation und Western-Blot nachgewiesen wurde. Dabei wurden die Mengen densitometrisch im Vergleich zu einem mitgeführten rekombinanten Standard bestimmt und mit dem korrespondierenden Serum verglichen (Abb.3-7).

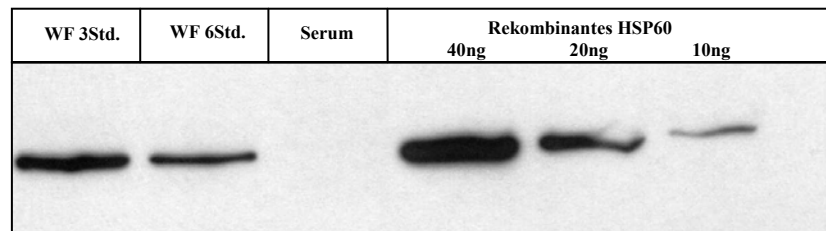


Abb. 3-7: Aufnahme eines repräsentativen Western-Blots zum Nachweis von HSP60.

Wundflüssigkeit und Serum wurden drei und sechs Stunden nach Operation gewonnen und mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot detektiert. Die Menge wurde anhand eines Standards aus rekombinanten HSP60 densitometrisch bestimmt.

Im Western-Blot zeigte sich deutlich, dass HSP60 in der Wundflüssigkeit in großer Menge vorlag, während es im Serum nicht nachweisbar war.

Ob dabei die HSP Konzentration mit der Intensität des Traumas korreliert, wurde mit Hilfe von Wundflüssigkeiten, die nach Operationen von unterschiedlichen Schweregraden gewonnen worden war, untersucht.

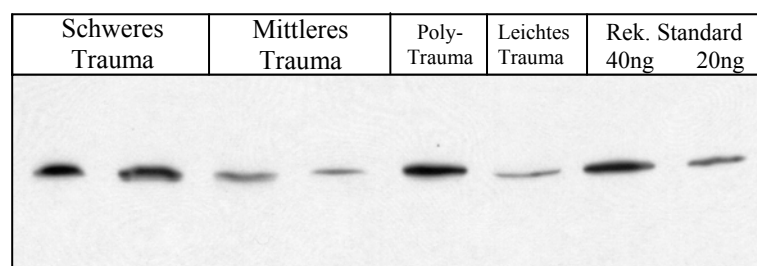


Abb. 3-8: Repräsentativer Western-Blot verschieden schwerer Operationen.

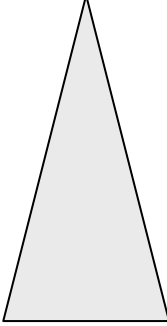
Wundflüssigkeit wurde drei und sechs Stunden nach Operation gewonnen und mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blot detektiert. Zum Vergleich ist ein rekombinanter Standard aufgetragen. Die Indizierung der Traumaintensität richtet sich nach Größe des Weichteilschadens der Operation.

Anhand der deutlichen dunkleren Färbung im Western-Blot (3-8) ist zu sehen, dass die Menge an HSP60 in der Wundflüssigkeit mit der Größe des Weichteilschadens korreliert.

Nachdem ein Zusammenhang der Traumaintensität (Größe des Weichteilschadens beim Patienten) mit der HSP60 Konzentration in der Wundflüssigkeit nachgewiesen wurde

(Abb. 3-8), wurden unterschiedliche Traumata von leichtem Weichteilschaden wie Handoperationen, über ausgedehnten Weichteilschaden wie Proximaler Femur Nagel (PFN), bis hin zu schweren Traumata wie Total-Endo-Prothese (TEP) und TEP-Tausch untersucht. Dabei wurden sowohl HSP60 als auch HSP70 in der Wundflüssigkeit und dem korrespondierenden Serum mittels Western-Blot und ELISA untersucht.

Tabelle 3-3: Aufstellung einiger Wundflüssigkeiten und korrespondierender Seren nach der Größe des Weichteilschadens und ihres HSP Gehaltes

Traumaintensität	HSP60 [ng/ml]		HSP70 [ng/ml]	
	Wundflüssigkeit	Serum	Wundflüssigkeit	Serum
<p>leicht</p>  <p>schwer</p>	69,5	nicht nachweisbar	64,8	nicht nachweisbar
	147,7		119,8	
	151,6		160,9	
	161,2		344,2	
	192,7		272,6	
	191,7		554,2	
	245,1		398,2	

Unterschiedliche Patienten wurden aufgrund des Weichteilschadens der Operation ausgewählt. HSP60 wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot und HSP70 direkt im ELISA nachgewiesen. Die HSP Konzentration stieg dabei mit dem Weichteilschaden an. Im Serum konnten beide HSP Formen nicht nachgewiesen werden. Dargestellt ist der Mittelwert derselben Wundflüssigkeit bei Dreifachbestimmung.

Es zeigt sich, dass die Menge an HSP60 in der Wundflüssigkeit bei steigender Traumaintensität, von leicht zu schwer zunimmt. Ebenso verhält es sich bei der HSP70 Konzentration, auch sie steigt bei größerem Weichteilschaden an. Systemisch wurde dabei die HSP Konzentration jedoch nicht soweit erhöht, dass sie im Serum nachweisbar gewesen wäre.

3.1.6 Kontrolle der Wundflüssigkeit und der erhöhten Proteinwerte

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sowohl die HSP-Konzentration, als auch die Zellzusammensetzung in den Wundflüssigkeiten unterschiedlich waren, musste überprüft werden, inwieweit die Abnahme der Wundflüssigkeit in die Drainageflaschen selbst eine

Wirkung auf die Proteinkonzentration oder die Zellzusammensetzung hatte. Dazu wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt:

Die Menge an HSP wurde sowohl in der frischen Wundflüssigkeit als auch nach deren zusätzlicher Lagerung für weitere 3 und 18 Stunden in der Drainageflasche bestimmt. Ebenso wurde die Wundflüssigkeit sofort nach Erhalt in eine neue Drainageflasche umgefüllt und für weitere 3 Stunden unter der Sterilbank belassen, um zu überprüfen, inwieweit sich die Monozyten an die Oberfläche der Drainageflasche anheften können und dadurch eine verringerte Anzahl der Monozyten zustande kam. Diese 3 Stunden Inkubation entsprechen der Lagerung während der Abnahme 3 Stunden und 6 Stunden nach Operationsende.

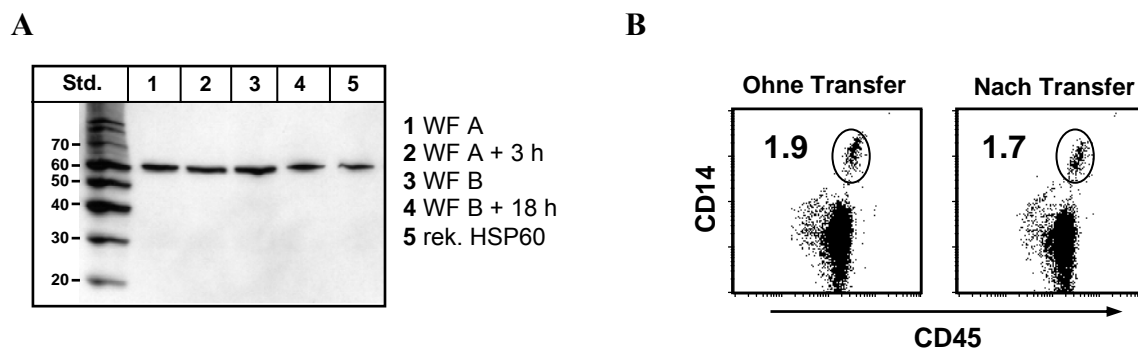


Abb. 3-9 A: Keine Zunahme des HSP60 Gehalts nach zusätzlicher Lagerung der Wundflüssigkeit. Western-Blot zweier Wundflüssigkeiten, welche nach Erhalt zusätzlich für 3 Std. und 18 Std. in derselben Drainageflasche gelagert und deren HSP60 Gehalt bestimmt wurde.
B: Keine Änderung der Monozytenanzahl nach zusätzlicher Lagerung der Wundflüssigkeit. Die Wundflüssigkeit wurde direkt nach Erhalt in eine neue Drainageflasche überführt und für zusätzliche 3 Std. gelagert. Die Monozytenanzahl wurde mittels Antikörperfärbung im Durchflusszytometer bestimmt.

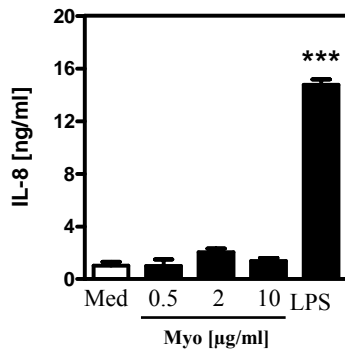
Die zusätzliche Lagerung in der Drainageflasche zeigt keine Zunahme der HSP60 Konzentration in der Wundflüssigkeit nach drei oder 18 Stunden. Ebenso ergab sich keine Veränderung der Monozytenanzahl nach der Überführung und Lagerung in einer frischen Drainageflasche. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Handhabung der Wundflüssigkeit nicht für die veränderte Zellzusammensetzung oder für den hohen HSP Gehalt in der Wundflüssigkeit verantwortlich war.

3.2.1 Die immunmodulierende Wirkung einiger Proteine in der Wundflüssigkeit

Einige Proteine, die in großer Menge in der Wundflüssigkeit nachgewiesen werden konnten, wurden auf ihre mögliche Beteiligung an der Wundflüssigkeit vermittelten Wirkung auf MNC untersucht. Dabei wurde die Hemmung der LPS-induzierten TNF- α Freisetzung und die

Stimulation von MNC zur IL-8 Synthese geprüft. Für die Untersuchung der veränderten LPS Antwort wurden MNC mit LPS alleine oder zusammen mit Myoglobin inkubiert und die Menge an TNF- α im Überstand mittels ELISA bestimmt.

A



B

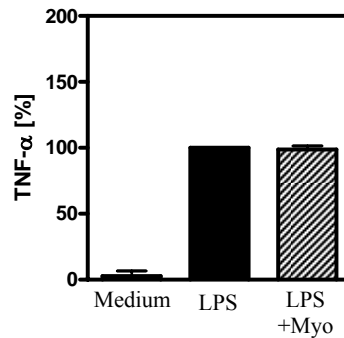


Abb. 3-10 Myoglobin (Myo) zeigt keine immunmodulierende Wirkung auf gesunde PBMC.

A: PBMC von gesunden Probanden wurden 48 Std. mit Myoglobin (0,5 2 und 10 μ g/ml), LPS (1 ng/ml) oder nur Medium inkubiert und die Menge an IL-8 mittels ELISA im Überstand bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplet-Bestimmungen. Die Auswertung erfolgte mit ANOVA. *** $p < 0.001$

B: Keine Immunmodulation der LPS Antwort durch Myoglobin

PBMC von gesunden Probanden wurden für 24 Stunden mit LPS (1 ng/ml), LPS mit Myoglobin (10 μ g/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die LPS Stimulation (8.7 ng/mL \pm SD 6.6 ng/mL) wurde auf 100 % normiert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung.

Die Inkubation mit LPS ergab eine deutliche IL-8-Produktion, während Myoglobin alleine keine stimulatorische Wirkung auf die MNC zeigte. Mit LPS stimulierte MNC sezernierten große Mengen an TNF- α . Die Gegenwart von Myoglobin hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte TNF- α -Produktion.

Um die immunmodulierende Wirkung des HSP60 und HSP70 zu untersuchen, wurden PBMC gesunder Probanden mit HSP60 oder HSP70 für 48 Stunden stimuliert und IL-8 im Überstand mittels ELISA bestimmt.

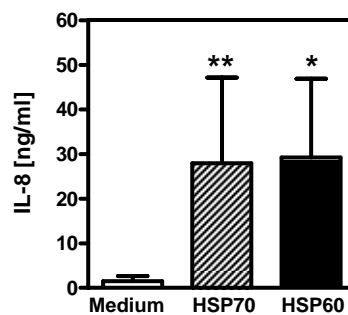


Abb. 3-11: Der Effekt von rekombinantem HSP auf die IL-8-Ausschüttung gesunder PBMC.

PBMC gesunder Probanden wurden für 48 Std. mit 50 μ g/ml HSP60 oder HSP70 inkubiert und die Menge an IL-8 im Überstand bestimmt. Die Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und HSP Stimulation wurden mittels ANOVA und Newman-Keuls Post-test ausgewertet. Die Daten zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten mit Mittelwert und Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Sowohl HSP60 als auch HSP70 zeigten eine deutliche IL-8 Sekretion nach 48 Stunden. Die rekombinanten Proteine zeigten damit dieselbe Chemokininduktion wie die Wundflüssigkeit selbst.

3.2.2 Die Wirkung des HSP ist durch Proteinase K aufhebbar

Als Nachweis, dass HSP und nicht möglicherweise in der HSP Präparation enthaltene Kontaminationen für die IL-8 Produktion verantwortlich waren, wurden die HSP mittels Proteinase zerstört und anschließend die Zytokin-Produktion getestet. Dazu wurden PBMNC gesunder Probanden für 48 Stunden entweder mit 50 µg/ml frischen HSP60 oder HSP70 stimuliert, oder das HSP wurde vorher in serumfreiem Medium mit Agarose-gekoppelter Proteinase K für 3,5 Stunden verdaut. Als Positiv-Kontrolle diente dabei ein Stimulationsansatz mit 0,1 ng/ml LPS, der ebenfalls dem Verdau unterzogen wurde.

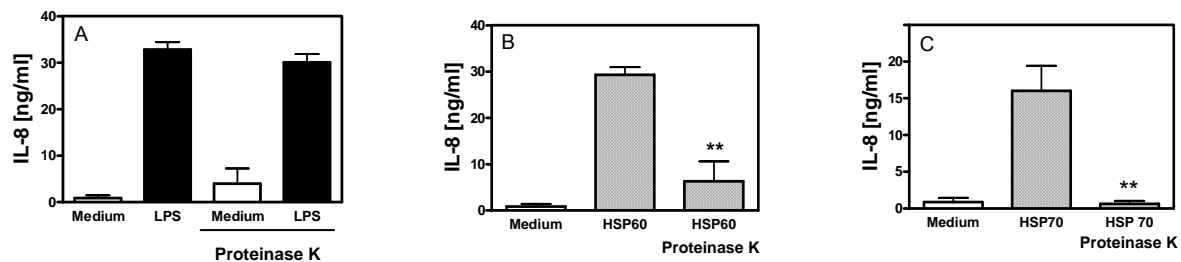


Abb. 3-12: Proteinase K Verdau von HSP und anschließende Stimulation der PBMNC.

PBMNC wurden für 48 Std. entweder mit Medium, LPS, HSP60 oder HSP70 oder mit denselben Stimuli nach einem 3,5 stündigem Proteinase K Verdau stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus Triplets eines Experiments. Student t-Test ** $p < 0,005$ HSP gegen HSP Proteinase K behandelt.

In Abbildung 3-12 A ist zu sehen, dass die Proteinase K Behandlung keinerlei Effekt auf die LPS Stimulation zeigt, während die Mediumwerte sogar leicht ansteigen. Die Stimulation von HSP60 und HSP70 wurde durch den Verdau fast vollständig aufgehoben (Abb. 3-12 B und C). Der stimulatorische Effekt des HSP beruht also nicht auf eine Verunreinigung des HSP, sondern ist eine Wirkung des Proteins selbst.

3.2.3 Der modulierende Faktor verändert die Zellen und ist löslich im Überstand vorhanden

Im Rahmen eines Versuchsprojektes zeigte sich, dass weder HSP60 noch HSP70 innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultur eine IL-8 Produktion durch MNC zeigten. Erst danach stieg die IL-8 Produktion stark an (vergleichend zu Abs. 3.2.1 und Abb. 3-11). Daher stellte sich die Frage, ob während der ersten 24 Stunden ein Faktor gebildet und sezerniert wird, der möglicherweise autokrin zur IL-8 Produktion stimuliert. Um diese Annahme zu testen, wurden PBMNC für insgesamt 48 Stunden kultiviert. Dabei wurde die 48 Stunden Inkubation mit folgenden Ansätzen verglichen.

PBMNC für 48 Stunden in Medium mit:

- A: PBMNC für 24 Stunden in Medium und für weitere 24 Stunden mit HSP60 oder HSP70 stimuliert.
- B: PBMNC für 24 Stunden mit HSP60 oder HSP70 stimuliert und nach einem Tausch des Überstandes (Mediumwechsel) für weitere 24 Stunden in Medium.
- C: PBMNC für 24 Stunden in Medium (Mediumswechsel) und für weitere 24 Stunden den Überstand aus den ersten 24 Stunden von Ansatz B.

Es wurden also alle Zellen für 48 Stunden inkubiert und bei den Ansätzen B und C das Medium nach 24 Stunden getauscht. Bei Ansatz B gegen normales, frisches Kulturmedium und bei Ansatz C gegen einen konditionierten Überstand aus einer 24 Stunden Inkubation mit HSP60 oder HSP70. Bei Ansatz A wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium mit HSP getauscht. Die Konzentration von IL-8 wurde nach 48 Stunden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Werte, für die IL-8 Produktion unbehandelter Zellen, wurde als horizontale Linie in den Graphiken eingezeichnet. Die Inkubation mit Medium alleine ergab für 48 Stunden einen Wert von 1,6 ng/ml und für 24 Stunden einen Wert unterhalb von 0,1 ng/ml IL-8.

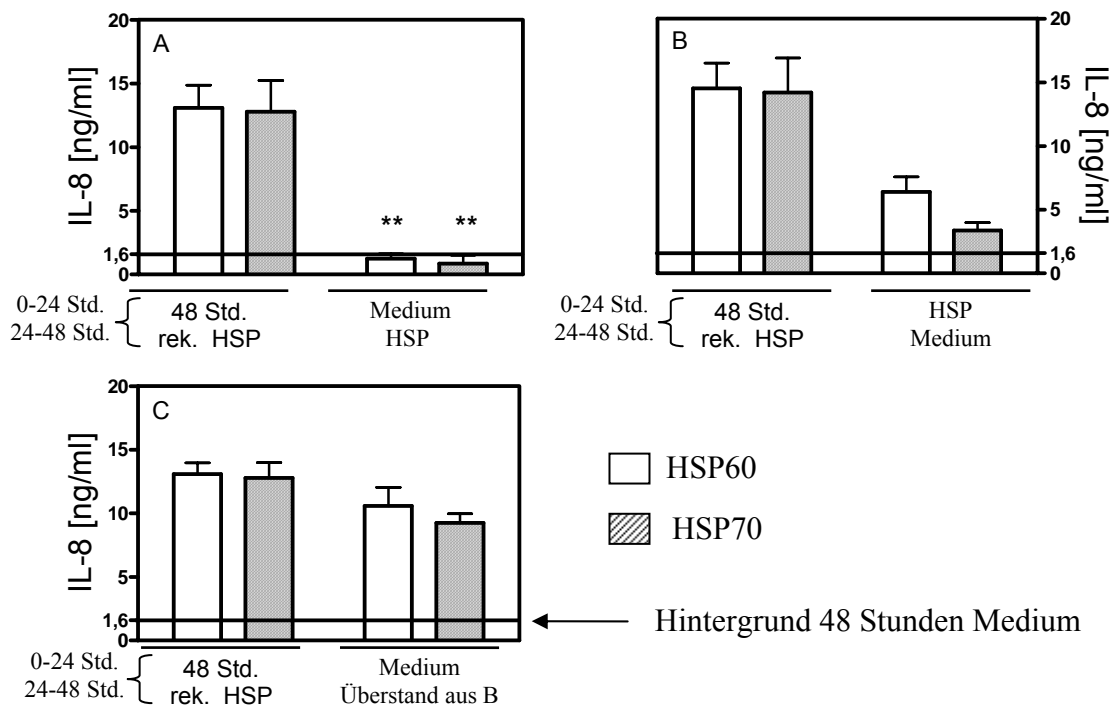


Abb. 3-13: PBMC wurden für 48 Std. mit 20 µg/ml HSP stimuliert.

Die unstimulierte Kontrolle ist als horizontale Linie eingezeichnet. Der Mediumwechsel bei unstimulierten PBMC ergab denselben Wert wie die Kontrolle. Es wurde mit den folgenden Ansätzen verglichen.

A: 24 Std. unbehandelte PBMC und nach einem Mediumwechsel für 24 Std. mit 20 µg/ml HSP für weitere 24 Std. kultiviert. B: 24 Std. Inkubation von PBMC mit HSP und nach einem Mediumwechsel eine weitere Inkubation in Medium für 24 Std. C: 24 Std. Inkubation in Medium und nach einem Mediumwechsel mit dem Medium von PBMC versetzt, die für 24 Std. mit 20 µg/ml HSP inkubiert worden waren (Überstand aus Ansatz B). Es sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei unabhängigen repräsentativen Experimenten gezeigt. Students t-Test ** p < 0,01 gegen 48 Stunden HSP Inkubation

Dieser Versuch zeigte, dass HSP nach 24 Stunden zu keiner IL-8 Sekretion führte, allerdings werden die Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden zur Sekretion eines Faktors stimuliert, welcher sich löslich im Überstand befand und mit dem Überstand auf vorher unbehandelte Zellen transferiert werden konnte. Dabei ist eine verbleibende Menge an HSP unerheblich, da eine 24 Stunden Inkubation, wie in Abbildung 3-13 A, nicht ausreichte, um die Zellen zu einer IL-8 Sekretion zu stimulieren. Wurde der Überstand nach 24 Stunden durch Medium ersetzt (Abb. 3-13 B), so sezernierten die Zellen in den darauf folgenden 24 Stunden immer noch IL-8, wenn auch in geringerem Maße als wenn sie über 48 Stunden mit HSP stimuliert worden wären. Die Zellen, welche den Überstand von Zellen, die 24 Stunden mit HSP inkubiert worden waren, erhielten (Abb. 3-13 C), zeigten nach 24 Stunden eine identische IL-8 Produktion zu den Zellen, die 48 Stunden mit HSP stimuliert worden waren.

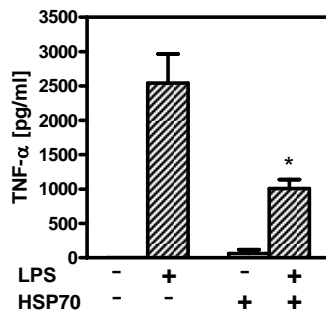
HSP scheinen die MNC über die Bildung eines unbekanntes Faktors zur Produktion von IL-8 zu stimulieren. Dieser Faktor ist löslich im Überstand vorhanden und lässt sich auf vorher

unstimulierte Zellen übertragen. Die Zellen selbst scheinen dabei nur gering verändert worden zu sein, da nach einem Mediumwechsel nur deutlich geringere Mengen an IL-8 sezerniert wurden.

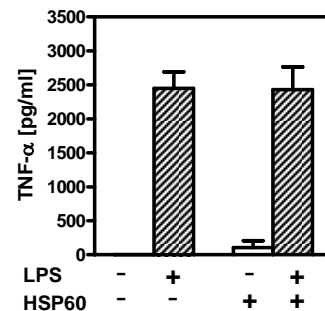
3.2.4 Modulation der LPS-induzierten TNF- α Synthese durch HSP

Für die Untersuchung der Modulation der LPS-Antwort wurden HSP60 oder HSP70 alleine oder zusammen mit LPS (1 ng/ml) zur Stimulation von MNC genutzt. Nach 24 Stunden wurde die TNF- α Produktion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Als Positiv-Kontrolle wurde mit LPS (1 ng/ml) stimuliert, unbehandelte Zellen dienten als Medium-Kontrolle.

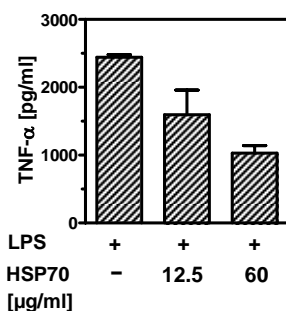
A



B



C



D

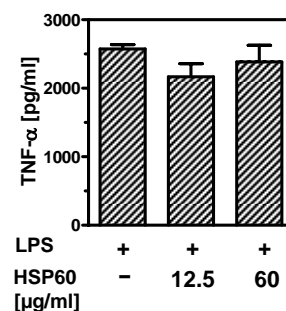


Abb. 3-14 A und B: Die Immunantwort von PBMC gesunder Probanden wird durch HSP moduliert. PBMC gesunder Probanden wurden mit 50 μ g/ml HSP70 (A) oder HSP60 (B) jeweils mit oder ohne LPS (1 ng/ml) stimuliert und TNF- α nach 24 Stunden mittels ELISA im Überstand bestimmt. Die Unterschiede zwischen LPS und LPS mit HSP wurden mittels Students paired t-Test ausgewertet. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente gezeigt. * $p < 0,05$.
C und D: PBMC gesunder Probanden wurden mit unterschiedlichen Mengen an HSP60, HSP70 und mit LPS (1 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert. Die Menge an TNF- α wurde im Überstand bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei doppelbestimmten Experimenten.

Bei der 48 Stunden Inkubation der MNC zeigte sich eine deutliche Induktion von IL-8 durch HSP60 und HSP70 (Abb. 3-11).

LPS (1 ng/ml) stimulierte die Freisetzung hoher Werte an TNF- α aus MNC, während weder HSP60 noch HSP70 alleine eine TNF- α Freisetzung aus MNC induzierten (Abb. 3-14 A und B). Wurde allerdings LPS mit HSP70 zusammen verwendet, so ergab sich eine Hemmung der TNF- α Freisetzung um 60 % (Abb. 3-14 C). Dieser hemmende Effekt des HSP70 zeigte sich ab einer Konzentration oberhalb von 10 μ g/ml HSP70 (Abb. 3-14 C). HSP60 hingegen zeigte keine inhibitorische Wirkung auf die TNF- α Sekretion. Beide rekombinanten Proteine, HSP60 und HSP70, induzierten IL-8, während nur HSP70 die LPS-induzierte TNF- α Antwort inhibieren konnte. Somit zeigte HSP70 vollständig und HSP60 teilweise dieselbe Wirkung auf MNC wie die Wundflüssigkeit.

3.2.5 Immunmodulation durch HSP

HSP70 reduzierte bei zeitgleicher Gabe mit LPS die LPS-vermittelte TNF- α Sekretion durch MNC (Abb.3-11). Eine vorausgehende Inkubation mit HSP könnte diese reduzierte TNF- α Sekretion möglicherweise noch verstärkt verändern. Um zu prüfen, ob das Ausmaß der modulatorischen Wirkung von HSP vom Zeitpunkt der Zugabe von LPS abhängt, wurden PBMNC mit LPS entweder parallel mit HSP oder 24 Stunden nach einer HSP Vorinkubation stimuliert und die TNF- α und die IL-6 Produktion im Überstand mittels ELISA bestimmt.

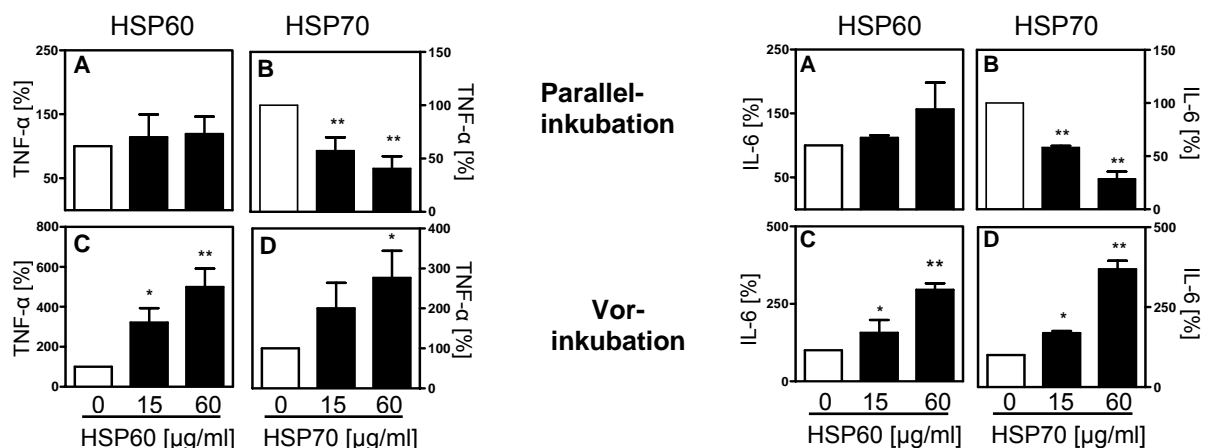


Abb. 3-15: Parallel- oder Vorinkubation mit HSP und LPS.

PBMNC gesunder Probanden wurden mit LPS (1 ng/ml), entweder parallel mit HSP (A, B), oder nach 24 Stunden Vorinkubation mit HSP (C, D) stimuliert. TNF- α und IL-6 wurden nach weiteren 24 Stunden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Um die Variation zwischen verschiedenen Experimenten zu kompensieren, wurde die LPS-Stimulation auf 100 % definiert (weißer Balken LPS 1 ng/ml) und alle Experimente darauf normiert. Die Absolutwerte von LPS alleine lagen bei 2373 ± 593 pg/ml für TNF- α und bei 2817 ± 215 pg/ml für IL-6. Students t-Test * p < 0,05; ** p < 0,01 HSP gegen LPS alleine. Die Daten zeigen das Ergebnis von drei bis vier unabhängigen Experimenten als Mittelwert mit Standardabweichung.

Die LPS-induzierte TNF- α beziehungsweise IL-6 Freisetzung wurde wie oben gezeigt bei paralleler Gabe von HSP70 dosisabhängig auf unter 50 % reduziert (Abb. 3-15 B), während HSP60 keinen Effekt zeigt (Abb. 3-15 A). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei einer 24 stündigen Vorinkubation sowohl mit HSP60 als auch mit HSP70 eine bis zu 5-fache Erhöhung der TNF- α Produktion und 4-fach bei IL-6 im Vergleich zur LPS Kontrolle. (Abb. 3-15 C, D).

3.2.6 Ausschluss von Kontamination des rekombinanten HSP als Ursache für die modulatorische Wirkung

Da immer wieder diskutiert wird, dass rekombinante Proteine eine Kontamination durch Endotoxine enthalten, wurde überprüft, ob die in Abschnitt 3.2.5 sichtbare Erhöhung der TNF- α Produktion durch eine Verunreinigung der rekombinanten Proteine durch LPS hervorgerufen sein könnte. Da auch das in dieser Arbeit benutzte HSP aus E.coli isoliert worden war, musste überprüft werden, inwieweit eine mögliche Kontamination mit LPS für die Immunmodulatorische Wirkung verantwortlich sein könnte.

Dazu wurde zuerst überprüft, ab welcher Menge LPS die PBMNC gesunder Probanden ein deutliches TNF- α Signal ergeben und ob diese durch HSP ebenfalls erreicht wird.

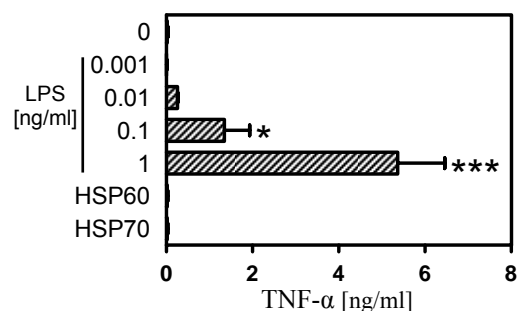


Abb. 3-16: Stimulation von PBMNC mit geringen Mengen an LPS.

PBMNC von gesunden Probanden wurden mit einer Verdünnungsreihe an LPS und mit HSP60 und HSP70 für 24 Stunden stimuliert. Der Gehalt an TNF- α wurde danach im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung mit * $p < 0.05$; *** $p < 0,001$

Die Stimulation von PBMNC mit 10 pg/ml LPS reichte aus, um nach 24 Stunden eine messbare Konzentration von TNF- α im Überstand mittels ELISA zu detektieren. Weder Medium noch HSP60 oder HSP70 stimulierten die TNF- α Sekretion der PBMNC (Abb. 3-16).

Nachdem gezeigt wurde, dass HSP alleine kein TNF- α induzierten, wurde die Vorinkubation im Vergleich zu Abschnitt 3.2.5 untersucht. Dazu wurden PBMNC für 24 Stunden mit unterschiedlichen Mengen an LPS (0-0,1 ng/ml) vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS für weitere 24 Stunden stimuliert. Die Menge an TNF- α wurde danach mittels ELISA bestimmt (Abb. 3-17A).

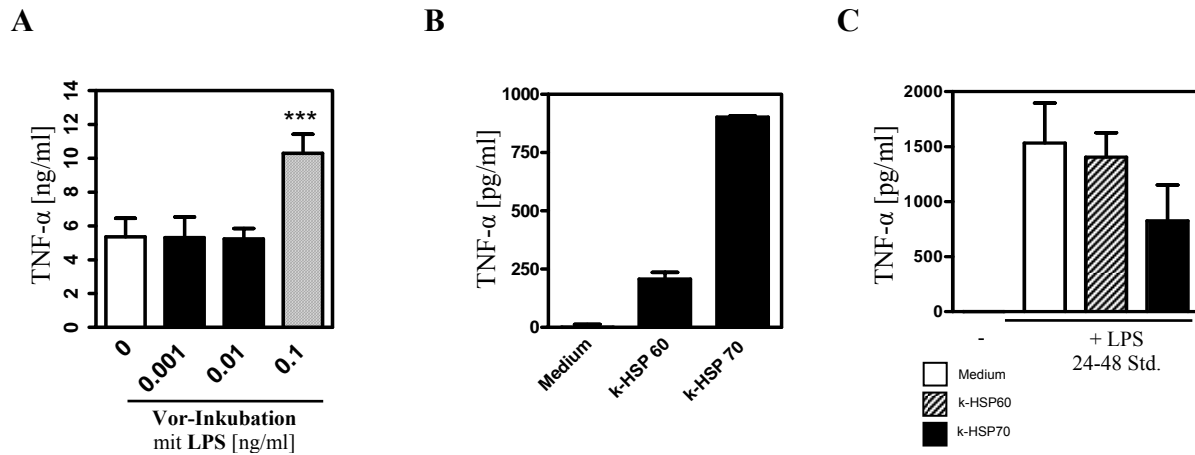


Abb. 3-17 A: Vorinkubation mit LPS

Eine Vorinkubation mit einer geringen LPS Dosis führt nicht zu einer Erhöhung der TNF- α Produktion bei anschließendem Stimulus mit 1 ng/ml LPS für 24 Stunden. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von Triplettkulturen. Students t-Test *** $p < 0,001$ gegen LPS alleine. (weißer Balken)

B: Die Wirkung von kontaminiertem HSP auf PBMNC.

Gesunde PBMNC wurden mit kontaminiertem HSP (k-HSP) für 24 Stunden inkubiert und TNF- α im Überstand mittels ELISA bestimmt. Es wurden jeweils 20 μ g/ml k-HSP eingesetzt.

C: Vorinkubation mit kontaminiertem HSP.

Gesunde PBMNC wurden erst für 24 Std. mit kontaminiertem HSP (k-HSP) stimuliert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 1 ng/ml LPS. Danach wurde TNF- α im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Vorbehandlung mit geringen Dosen LPS zeigte keine Erhöhung der TNF- α Sekretion in den PBMNC. Die Vorinkubation mit 0,1 ng/ml LPS führte zu einer erhöhten TNF- α Produktion, die mit der additiven TNF- α Produktion aus den ersten 24 Stunden übereinstimmen (vergleiche Abb. 3-16).

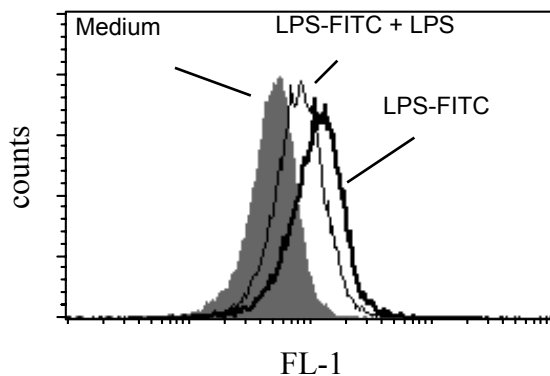
Einige Chargen von HSP zeigten alleine eine TNF- α Induktion nach kurzer Zeit. Um die Möglichkeit einer Kontamination der rekombinanten Proteine mit bakteriellen Bestandteilen (E.coli; LPS) zu überprüfen, wurden PBMNC gesunder Probanden mit möglicherweise kontaminiertem HSP (k-HSP) inkubiert und nachträglich mit LPS für weitere 24 Stunden stimuliert. Diese als k-HSP bezeichnete Charge wurde nicht für Experimente verwendet, da sie ein Stimulationsmuster wie LPS zeigte und sowohl IL-8 als auch TNF nach kurzer Zeit induzieren konnten. Dabei zeigte sich, dass bereits 20 μ g/ml k-HSP in der Lage waren, eine deutliche TNF- α Antwort nach 24 Stunden in den PBMNC zu induzieren (Abb. 3-17 B), während diese bei nicht kontaminiertem Protein nicht auftrat (Abb. 3-14 A; B). Eine weitere LPS Stimulation für 24 Stunden, vergleichend zu Abbildung 3-16, zeigte keine signifikanten

Unterschiede zwischen k-HSP Stimulation und LPS Stimulation. Es ergab sich eher ein zur HSP-Vorinkubation entgegengesetzter Effekt (Abb 3-15). Es zeigt sich zwischen k-HSP und LPS ein ähnlicher Verlauf. Das hochaufgereinigte HSP zeigte keine TNF- α Stimulation und modulierte die TNF- α Antwort der Zellen unterschiedlich zur Vorbehandlung. Somit zeigte es ein unterschiedliches Stimulationsmuster, sowohl zu LPS als auch einem kontaminierten HSP.

3.2.7 Das Bindungsverhalten von LPS wird durch HSP nicht verändert

Die Veränderung der LPS-induzierten TNF- α Antwort durch HSP könnte in einer Veränderung des Bindungsverhaltens oder der Bindungskapazität des LPS an die Monozyten liegen. Um dieses zu überprüfen, wurde FITC-markiertes LPS für Bindungsstudien im Durchflusszytometer verwendet.

A



B

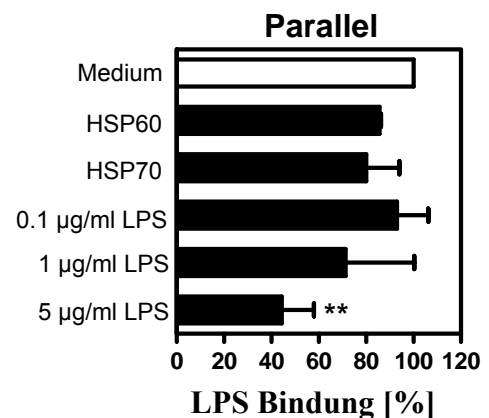


Abb. 3-19 : Bindung von FITC markiertem LPS an PBMC

Die PBMC wurden mit markiertem LPS (LPS-FITC), unmarkiertem LPS zusammen mit markiertem LPS (LPS-FITC + LPS) oder mit Medium alleine für 30 Minuten inkubiert und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer bestimmt.

(A) Die Erhöhung der Fluoreszenz durch die Bindung von LPS-FITC (starke Linie) im Vergleich zu Medium alleine (grau) und die Verdrängung des markierten LPS durch Zugabe von unmarkiertem LPS (dünne Linie).

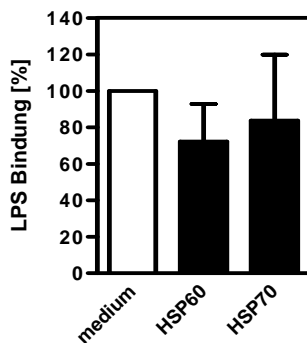
(B) PBMC wurden entweder mit Medium (weiß) oder mit 60 µg/ml HSP (schwarz) oder unterschiedlichen Dosen unmarkiertem LPS (schraffiert) stimuliert und mit FITC-markiertem LPS markiert. Danach wurde die Fluoreszenz im Durchflusszytometer bestimmt, die Mediumkontrolle auf 100 % definiert und alle Werte auf die Kontrolle normiert, um die Schwankungen zwischen den Experimenten auszugleichen. Die Daten zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Students t-Test ** p < 0,01 gegen Medium.

Zellen, die mit LPS-FITC inkubiert worden waren, zeigten eine höhere Fluoreszenzintensität als unbehandelte Zellen und wurden im Durchflusszytometer untersucht. Die parallele Zugabe von unmarkiertem LPS zu LPS-FITC reduzierte die Floreszenzintensität (Abb. 3-19 A). Wurde HSP oder bis zu 1 µg/ml unmarkiertem LPS zugesetzt, so änderte sich das

Bindungsverhalten des FITC markierten LPS nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ unmarkiertem LPS ergab sich ein signifikanter Abfall der Bindung des markierten LPS (Abb. 3-19 B). Die Inkubation mit beiden HSP-Formen zeigte keine Auswirkungen auf das Bindungsverhalten des markierten LPS.

Um zu prüfen, ob eine Vorinkubation mit HSP die Bindung von LPS auf Monozyten erhöht, wurden PBMNC mit Medium oder mit 60 $\mu\text{g/ml}$ HSP60 bzw. HSP70 vorinkubiert, nach 24 Stunden mit LPS-FITC inkubiert und die Bindung des markiertem LPS auf den Monozyten im Durchflusszytometer bestimmt. Als Vergleich wurden die Zellen mit unmarkiertem LPS vorinkubiert (Abb. 3-20).

A



B

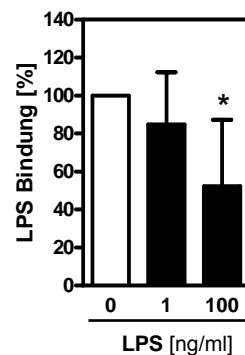


Abb. 3-20: Beeinflussung der Bindung durch Vorinkubation.

PBMNC wurden mit Medium oder 60 $\mu\text{g/ml}$ HSP (A) oder mit unmarkiertem LPS (1 oder 100 ng/ml) (B) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde FITC-markiertes LPS zugesetzt und die Bindung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Medium-Werte wurden jeweils auf 100 % definiert und die restlichen Werte auf diese Kontrolle normiert. Die Graphen zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Students t-Test * $p < 0,05$

Die Vorinkubation mit HSP60 und HSP70 zeigte keine signifikante Änderung in der Bindung des markierten LPS-FITC (Abb. 3-20 A), während die Vorinkubation mit unmarkiertem LPS die Bindung des LPS-FITC an die Monozyten deutlich reduzierte (Abb.3-20 B). Demnach beeinflussen weder HSP60 noch HSP70 die Bindung von LPS auf Monozyten.

3.2.8 HSP70 erhöht die TLR4 Expression auf Monozyten.

Das LPS Signal wird durch Bindung des LPS an CD14 und der anschließenden Assoziation des TLR4/MD-2 Komplexes, welcher die Signaltransduktion auslöst, vermittelt. Daher wurde überprüft, inwieweit die Inkubation mit HSP oder LPS die Expression dieses Signalkomplexes auf Monozyten beeinflusst. Dazu wurden PBMNC mit Medium, LPS oder

HSP60 bzw. HSP70 für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Expression von CD14 und dem TLR4 am Durchflusszytometer untersucht.

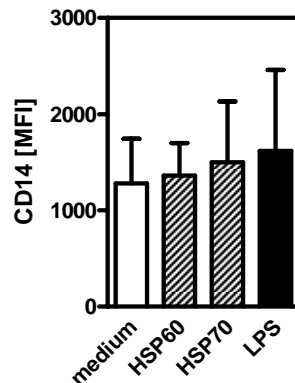


Abb. 3-21: Keine CD14 Regulation durch HSP

PBMNC wurden mit Medium, 60 µg/ml HSP60 oder HSP70 oder 1 ng/ml LPS inkubiert und mit einem Anti-CD14 Antikörper gefärbt. Die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der CD14 positiven Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Dabei ist keine signifikante Veränderung in der Expression zu erkennen.

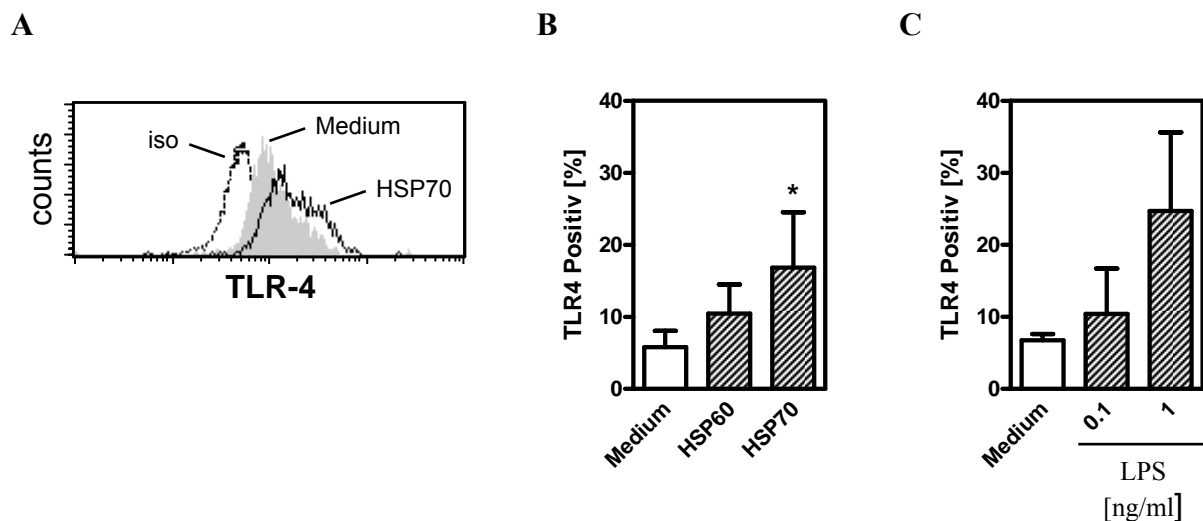


Abb. 3-22: TLR4 Expression auf PBMNC nach Inkubation mit HSP oder LPS

A: PBMNC wurden mit Medium (grau) oder HSP70 (schwarze Linie) inkubiert, mit anti-TLR4 Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer die CD14 positiven (Monozyten) Zellen in ihrer Expression bestimmt. Als Kontrolle wurde mit dem Isotypen (gepunktete Linie) gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment als Histogramm.

B und C: Prozentuale Darstellung der TLR4 Expression von Monozyten (CD14 positiv) nach Medium, 60 µg/ml HSP60 oder 60 µg/ml HSP70 (B) oder LPS (C) Stimulation. Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Experimenten. Students t-Test * $p < 0,05$ gegen Medium

Es zeigte sich, dass weder LPS noch HSP60 und HSP70 die Expression des CD14 beeinflussen (Abb. 3-21).

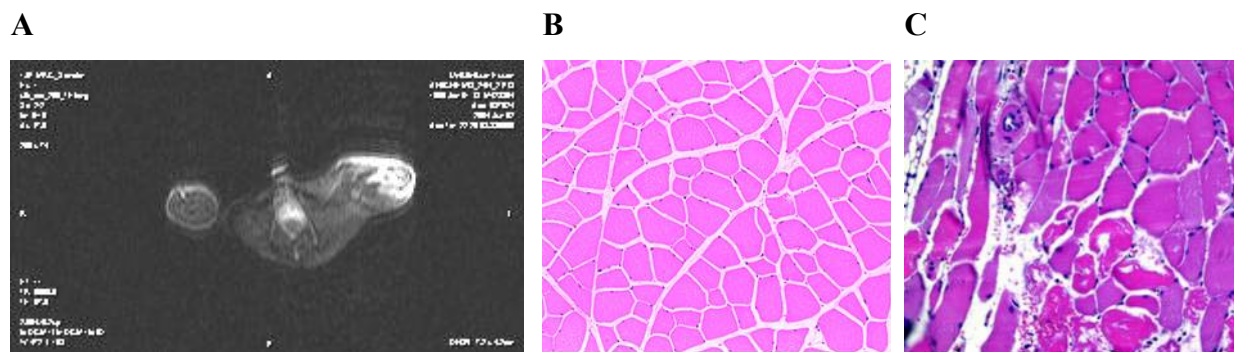
Auf sechs Prozent der unstimulierten Monozyten konnte der TLR4 nachgewiesen werden. Nach der Inkubation mit HSP70 stieg die Expression des TLR4 signifikant auf 17 % der Monozyten an. Monozyten, die mit HSP60 inkubiert worden waren, zeigten ebenfalls eine Tendenz zur erhöhten TLR4-Expression. Nach Stimulation mit 1 ng/ml LPS, aber noch nicht

bei 0,1 ng/ml LPS, stieg der Anteil der TLR4 positiven Monozyten auf über 20 % an. HSP70 und höhere Dosen von LPS verstärken die Expression von TLR4 auf Monozyten. Die Expression von CD14 blieb unverändert.

3.3.1 Wirkung eines definierten Weichteiltraumas in der Maus

Es wurde zuvor gezeigt, dass intrazelluläre Proteine, wie zum Beispiel HSP, durch Gewebeschädigung freigesetzt werden. Um die Wirkung einer Gewebeschädigung durch Traumata *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell für Weichteiltrauma genutzt.

Dazu wurde in einem Mausmodell ein definiertes Trauma des m. gastrocnemius durch ein frei-fallendes Gewicht erzeugt. Dieses geschlossene Weichteiltrauma ohne Fraktur führte zu einer lokalen Weichteilschädigung und zeigte einen deutlichen Muskelschaden und deutliche Ödembildung.



3-22 A: Das Trauma induzierte Ödem im MRT- short tau inversion recovery (STIR). Deutlich ist das ausgedehnte Ödem an der hellen Färbung zu erkennen.

B/C: Mikroskopische Aufnahme eines unbehandelten Muskels (links) und des Traumabereichs nach 24 Stunden in 160 facher Vergrößerung (rechts). Im Traumabereich sind deutlich ein Ödem und eingewanderte Granulozyten sichtbar. Im Vergleich ist die geordnete Struktur der Muskelfasern im Kontrollmuskel (links) zerstört.

Auf der MRT-Aufnahme (Abb. 3-22 A) ist deutlich die Ödembildung durch das Trauma zu erkennen. Dabei liegt die Maus auf dem Rücken und das linke Bein ist traumatisiert worden. Die helle Färbung zeigt dabei die Flüssigkeitsansammlung des Ödems.

In der HE-Färbung (Abb. 3-22 B und C) ist im linken Bild die geordnete und gleichmäßige Struktur eines unbehandelten Muskels zu sehen. Im rechten Bild ist das Trauma als deutliche Schädigung der Muskelfasern zu erkennen. Die geordnete Struktur ist geschädigt und es gibt große ungeordnete Bereiche mit Flüssigkeitsansammlungen. Im Mausmodell wird demnach ein großes Weichteiltrauma ohne Knochenfraktur erzeugt.

3.3.2 Freisetzung von HSP60 aus dem traumatisierten Muskel

Innerhalb des Traumamodells an der Maus wurde untersucht, ob auch hier eine Freisetzung intrazellulärer Proteine vorliegt. Dazu wurden die traumatisierten Muskeln homogenisiert und mittels Immunpräzipitation und Western-Blot der Gehalt an HSP60 in dem Homogenat bestimmt.

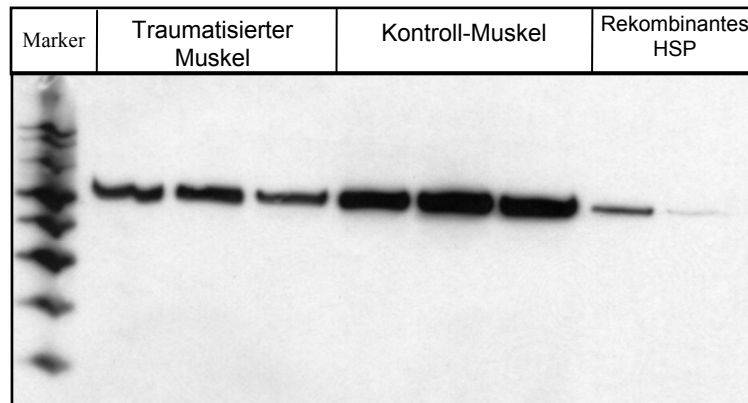


Abb. 3-23: Western-Blot der HSP60 Bestimmung von traumatisierten und nicht traumatisierten Muskeln der Maus.

Der m.gastrocnemius wurde traumatisiert und danach die HSP60 Menge im Muskelhomogenat mittels Immunpräzipitation und Western-Blot nachgewiesen. Als Kontrolle wurde rekombinantes HSP60 aufgetragen.

Die Menge an HSP60 im Trauma-Muskel (Abb. 3-23 links) war deutlich geringer als im unbehandelten Muskel des Kontrolltieres (Abb. 3-23 rechts). Das HSP60 wurde demnach aus den traumatisierten Zellen freigesetzt. Systemisch konnte kein HSP im Serum nachgewiesen werden.

3.3.3 LSM Aufnahmen der Muskeln

Anhand der Untersuchungen der Wundflüssigkeiten von Patienten wurde gezeigt, dass nach Gewebeschaden austretende Faktoren die Produktion von Chemokinen aus MNC induzieren. Chemokine wirken chemoattraktiv auf Leukozyten. Mit Hilfe des Mausmodells wurde nun überprüft, inwieweit eine Gewebeschädigung eine Infiltration von Zielzellen zur Folge hat. Um die Zellinfiltration sichtbar zu machen, wurden die traumatisierten Muskeln geschnitten (Kryoschnitte) und mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Dabei wurde Laminin jeweils rot angefärbt und die Zellkerne mittels einer DAPI Färbung blau. Die zu untersuchenden Zellarten wurden jeweils FITC markiert und erscheinen in grün. Es wurden drei Zeitpunkte

ausgewählt. Ein Tag als Akut-Phase nach Trauma, vier Tage als Phase der Regeneration und sieben Tage, da dort der Muskel in der Maus makroskopisch wieder regeneriert erschien.

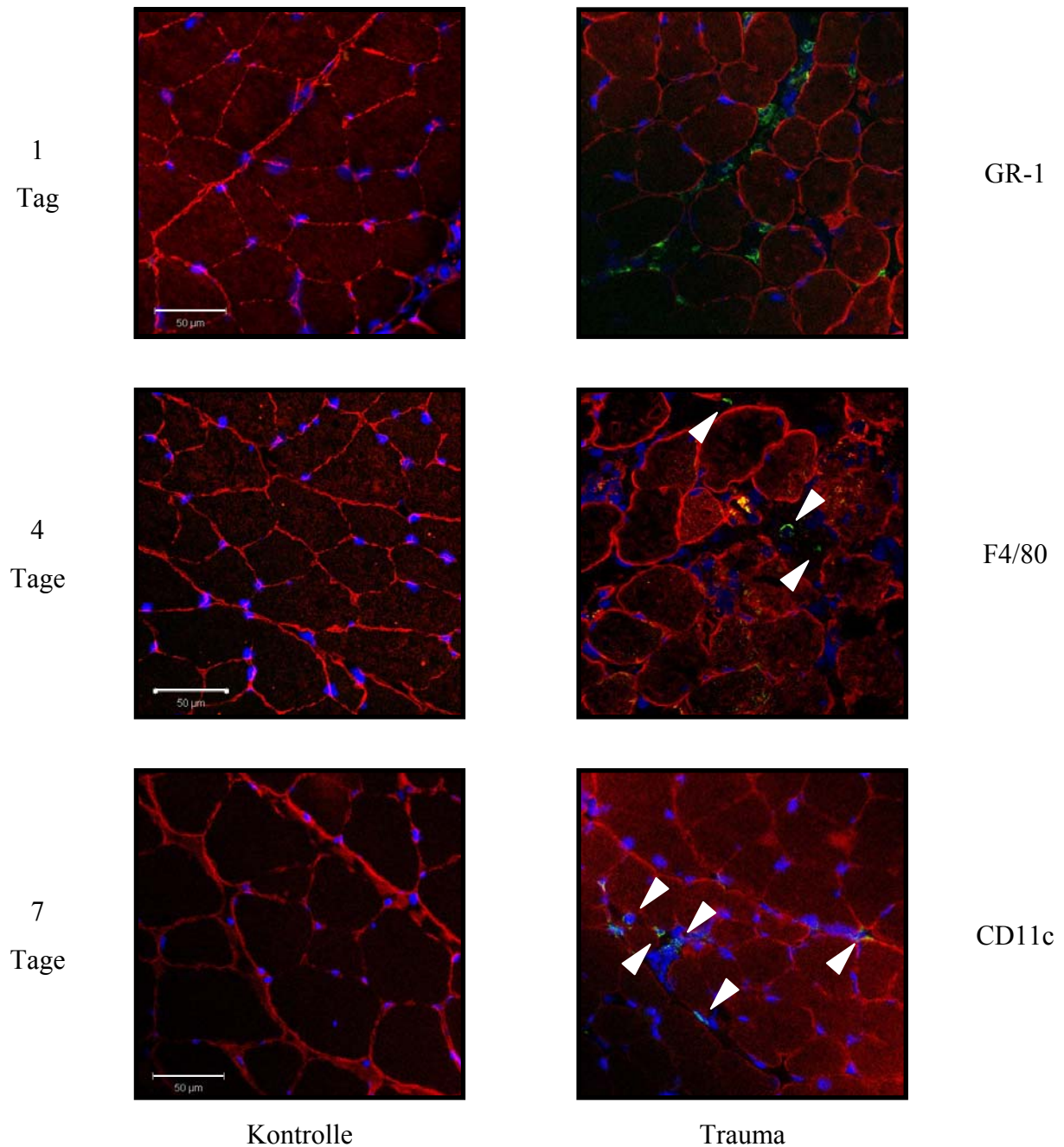


Abb. 3-24: Laserscanmikroskopische Aufnahme der Querschnitte durch Muskeln einen, vier und sieben Tage nach Trauma.

Links sind jeweils die Kontrollmuskeln und rechts die traumatisierten Muskeln dargestellt. Laminin wurde rot und die Zellkerne in blau (DAPI) eingefärbt. Der indizierte Antikörper ist jeweils grün dargestellt. Granulozyten sind GR-1 positiv, Makrophagen F4/80 positiv und dendritische Zellen CD11c positiv. Es sind jeweils repräsentative Aufnahmen mehrerer Traumaexperimente gezeigt. Die Pfeile zeigen auf FITC positive Zellen.

In den Laser-Scan-Mikroskopischen (LSM) Aufnahmen ist der Verlust der geordneten Muskelstruktur unmittelbar durch das Trauma gut zu erkennen, ebenso wie der langsame

Wiederaufbau über den Verlauf von sieben Tagen. Diese Beobachtung stimmte auch mit den Beobachtungen beim Präparieren der Muskeln überein.

Es war in allen Traumaschnitten eine massive Infiltration von Zellen zu sehen (DAPI=blaue Zellkerne). Es ist deutlich zu sehen, dass nach 24 Stunden die Granulozyten (GR-1 positiv) einströmen, während Makrophagen (F4/80 positiv) erst nach vier Tagen und dendritische Zellen (CD11c positiv) erst nach vier bis sieben Tagen in größerer Anzahl nachzuweisen waren.

3.3.4 Zellinfiltration in den geschädigten Muskel

Um die mittels histologischer Analyse nachgewiesene Infiltration in den geschädigten Muskel zu quantifizieren, wurde Muskelgewebe durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die Muskeln nach einem, vier und sieben Tagen nach Trauma entnommen, mittels Kollagenase verdaut und im Durchflusszytometer auf ihre Zellzusammensetzung hin untersucht. Dabei wurden Granulozyten als GR-1 positiv und CD11b positiv, Makrophagen als GR-1 negativ CD11c negativ und CD11b positiv und dendritische Zellen als CD11c positiv definiert. Es sind jeweils die Prozentzahlen an den verschiedenen Gates angezeigt.

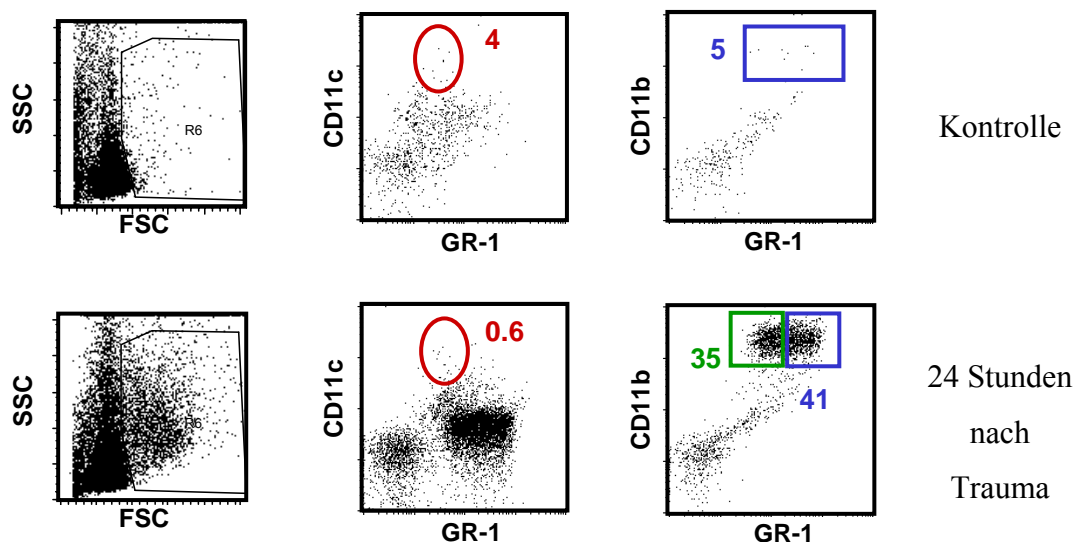


Abb. 3-25A: Infiltration nach 24 Stunden

Die aus den Muskeln gewonnenen Zellen wurden mit Antikörpern gefärbt und identifiziert. Dargestellt sind repräsentative Dotplots von traumatisierten und unbehandelten Muskeln zur Bestimmung der Granulozyten (GR-1 positiv), der dendritischen Zellen (CD11c positiv) und der Makrophagen (CD11b positiv, GR-1 negativ CD11c negativ). Dabei sind die Granulozyten durch blaue, die Makrophagen durch grüne und die dendritischen Zellen durch rote Gates gekennzeichnet. Die Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Zellen an.

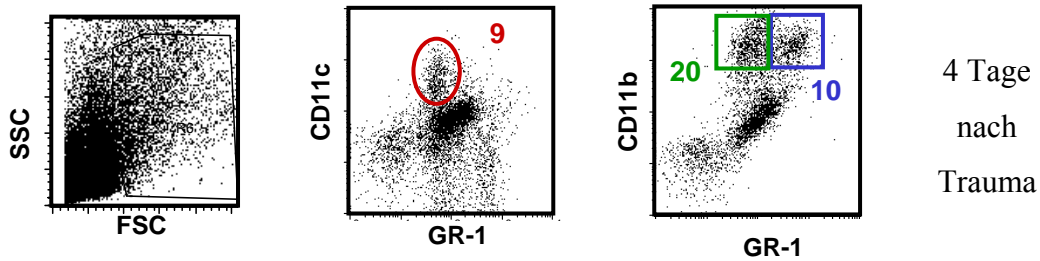


Abb. 3-25 B: Infiltration nach vier Tagen

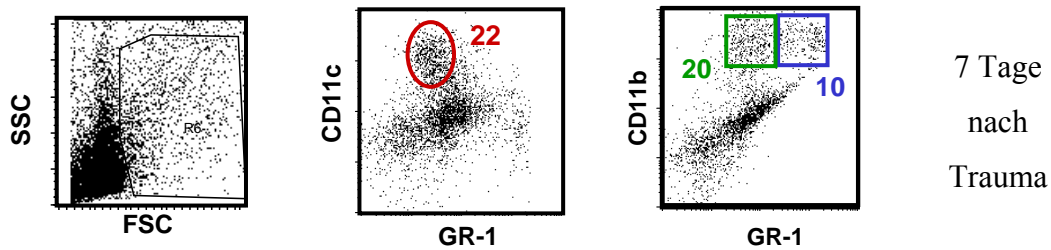


Abb. 3-25 C: Infiltration nach sieben Tagen

Durch dieses Experiment konnte der Einstrom von Leukozyten in den Muskel sichtbar gemacht werden. Dabei war zu sehen, dass es nach der Schädigung des Muskels zuerst zu einem Einstrom der Granulozyten und Makrophagen kam, wobei die Granulozyten anteilmäßig am stärksten einwanderten (Abb. 3-25 A). Die Menge der Granulozyten nahm dabei prozentual zum Tag vier und sieben hin ab, während der Anteil der Makrophagen konstant blieb. Die dendritischen Zellen lagen erst relativ spät, ab Tag vier, und deutlich, an Tag sieben, vor (Abb. 3-25 B und C).

Um die absolute Zahl der infiltrierenden Leukozyten pro Muskel zu bestimmen, wurden die Zellen im Muskel mithilfe von TrueCount Röhren quantifiziert und anhand der prozentualen Zusammensetzung auf alle untersuchten Zellen umgerechnet.

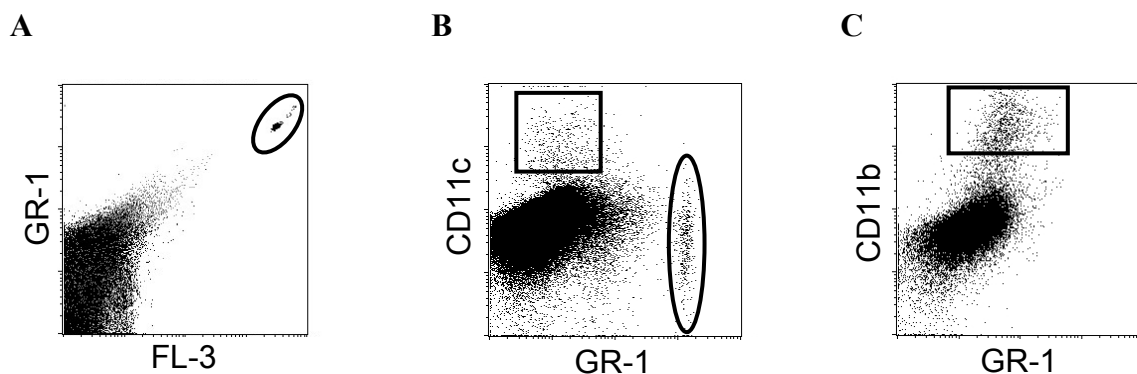


Abb. 3-26 A: Dotplot der Beads für die Truecount-Bestimmung

In dem repräsentativen Dotplot kann man im markierten Bereich die TrueCount-Beads erkennen, die zur Errechnung der absoluten Zellzahl genutzt wurden.

B und C: repräsentative Dotplots von traumatisierten Muskeln zur Bestimmung der Granulozyten (GR-1 positiv) und dendritischen Zellen (CD11c positiv) (A) und der Makrophagen (CD11b positiv, Gr-1 negativ CD11c negativ) (B).

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen im verdauten Muskel wurden die Zellen mit anti-GR-1, anti-CD11c und anti-CD11b gefärbt und damit die prozentualen Anteile pro Muskel bestimmt. Die Anzahl der Granulozyten wurde mithilfe von TrueCount-Beads absolut bestimmt und danach anhand der prozentualen Anteile jede Zellart berechnet. Da die Gesamtanzahl der Beads bekannt ist, wurde folgende Formel verwendet: Anzahl der gemessenen Granulozyten * Gesamtzahl der Beads pro TrueCount-Röhrchen / gemessene Anzahl der Beads. Dieses Ergebnis wurde nun mit dem Quotienten aus Gesamtvolumen / eingesetzte Menge des Muskelhomogenats multipliziert. Auf diese Weise erhält man die Gesamtzahl der Granulozyten pro Muskel. Mithilfe der anteiligen prozentualen Verhältnisse wurde die Anzahl der anderen Zellarten bestimmt.

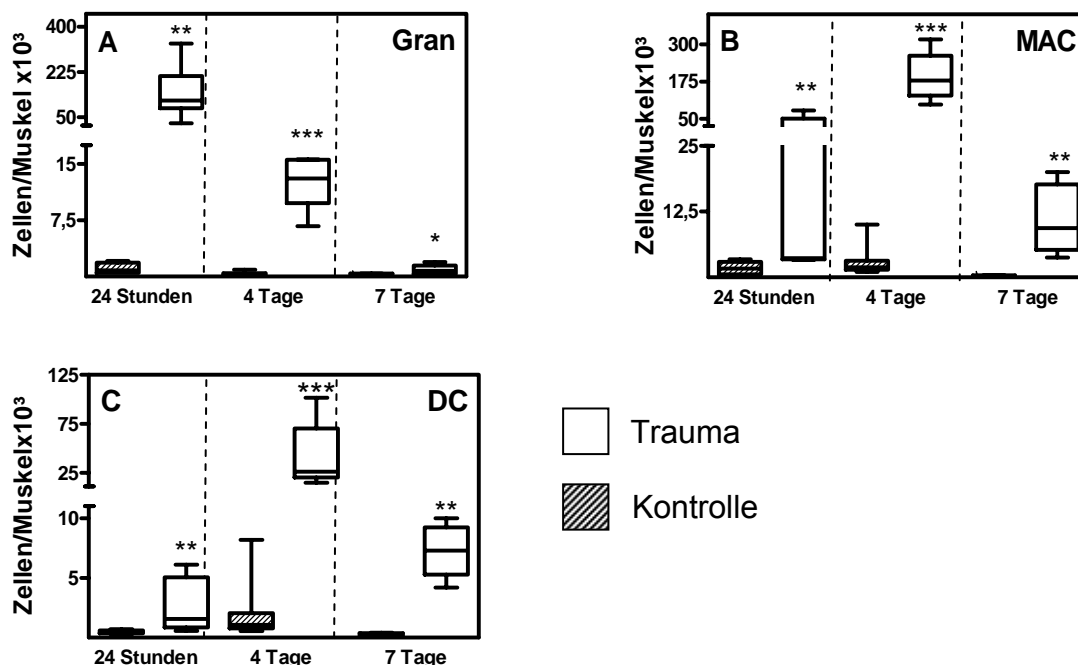


Abb. 3-27: Zellzahlen pro Muskel

Im Boxplot sind die Zellzahlen pro Muskel nach Trauma und im unbehandelten Muskel dargestellt. Die horizontalen Linien geben den Median an. Die Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit sechs bis acht Tieren. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ Students t-test Trauma gegen Kontrolle.

Im Vergleich der prozentualen Angaben aus Abbildung 3-25 und den Absolutzahlen aus Abbildung 3-27 zeigte sich, dass der prozentuale Anstieg der Granulozyten direkt nach dem Trauma auch in Absolutzahlen sehr deutlich zu erkennen war, und die Anzahl über Tag vier zum Tag sieben fast wieder auf den Kontrollwert absank. Die Anzahl der Makrophagen stieg zum Tag vier hin an. Dort erreichten die Makrophagen fast dieselbe Anzahl wie die Granulozyten am ersten Tag. Danach sank ihre Anzahl stark zum Tag sieben hin ab. Die

Anzahl der dendritischen Zellen stieg ebenfalls zum Tag vier hin an. Im Vergleich der Anzahl der Makrophagen und dendritischen Zellen zeigt sich eine höhere Anzahl an Makrophagen an Tag vier, während am Tag sieben die Anzahl der dendritischen Zellen ebenso hoch ist wie die der Makrophagen. Die dendritischen Zellen zeigten keinen so deutlichen Abfall in ihrer Population wie Granulozyten und Makrophagen.

3.3.5 Untersuchung der m-RNA in den Muskeln

Da gezeigt werden konnte, dass verschiedene Zellarten nach Trauma den Muskel infiltrieren, stellte sich die Frage, welche Chemokine im Muskel produziert werden und diese Infiltration vorantreiben könnten. Dazu wurden traumatisierte Muskeln homogenisiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer PCR unter Verwendung spezifischer Primer auf ausgewählte Chemokine hin untersucht.

Dabei wurden Primer für MIP-1 α , MIP-2, SDF, MCP-1 und als Kontrolle HPRT benutzt. Da sowohl MIP-2 wie auch SDF keine Regulation zeigten, sind nur die Ergebnisse für MIP-1 α MCP-1 und HPRT dargestellt (Abb. 3-28).

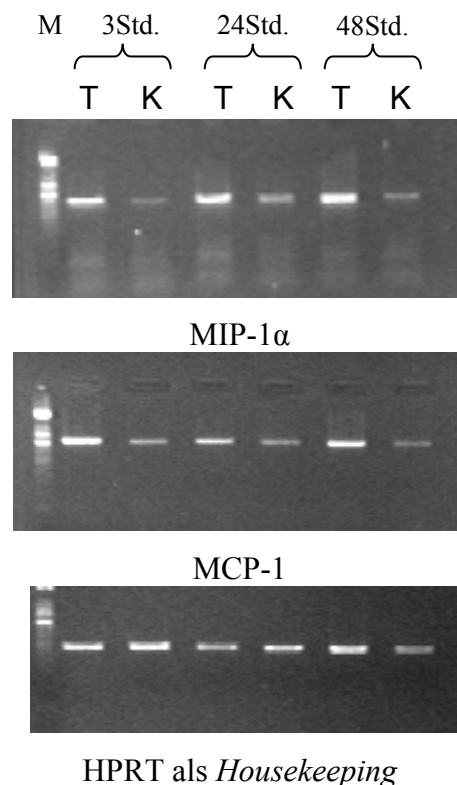


Abb. 3-28: PCR Photos von repräsentativen Ergebnissen mit MIP-1 α und MCP-1. HPRT wurde dabei als Kontrolle mitgeführt.

Die aufgereinigte mRNA aus den Muskeln wurde in cDNA umgeschrieben, in die PCR eingesetzt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und fotografiert. Trauma- und Kontroll-Muskel sind jeweils nebeneinander dargestellt, wobei eine schwächere Färbung eine geringere DNA Menge nach der PCR anzeigt.

In Abbildung 3-28 ist zu sehen, dass es für MCP-1 und MIP-1 α zu einer unterschiedlichen mRNA Expression kam. Sowohl MIP-1 α wie auch MCP-1 zeigten bei allen drei Zeitpunkten eine deutlich stärkere Bande in der Traumaprobe. Die korrespondierende Kontrolle ist jeweils als schwache Bande zu sehen, während der traumatisierte Muskel ein deutliches Signal ergab. Dieses zeigt eine deutliche Hochregulation der mRNA-Expression für die Chemokine an. Das nicht regulierte HPRT zeigt an, dass dieser Unterschied nicht auf unterschiedliche Mengen an eingesetzter cDNA zurückzuführen ist. Um zu prüfen, ob diese Veränderung der mRNA-Expression mit einer veränderten Proteinmenge im Muskel nach Trauma korreliert, wurden in homogenisiertem Muskelgewebe die Chemokinmengen von KC (Maushomologon zum humanem IL-8), MCP-1 und MIP-1 α im ELISA bestimmt.

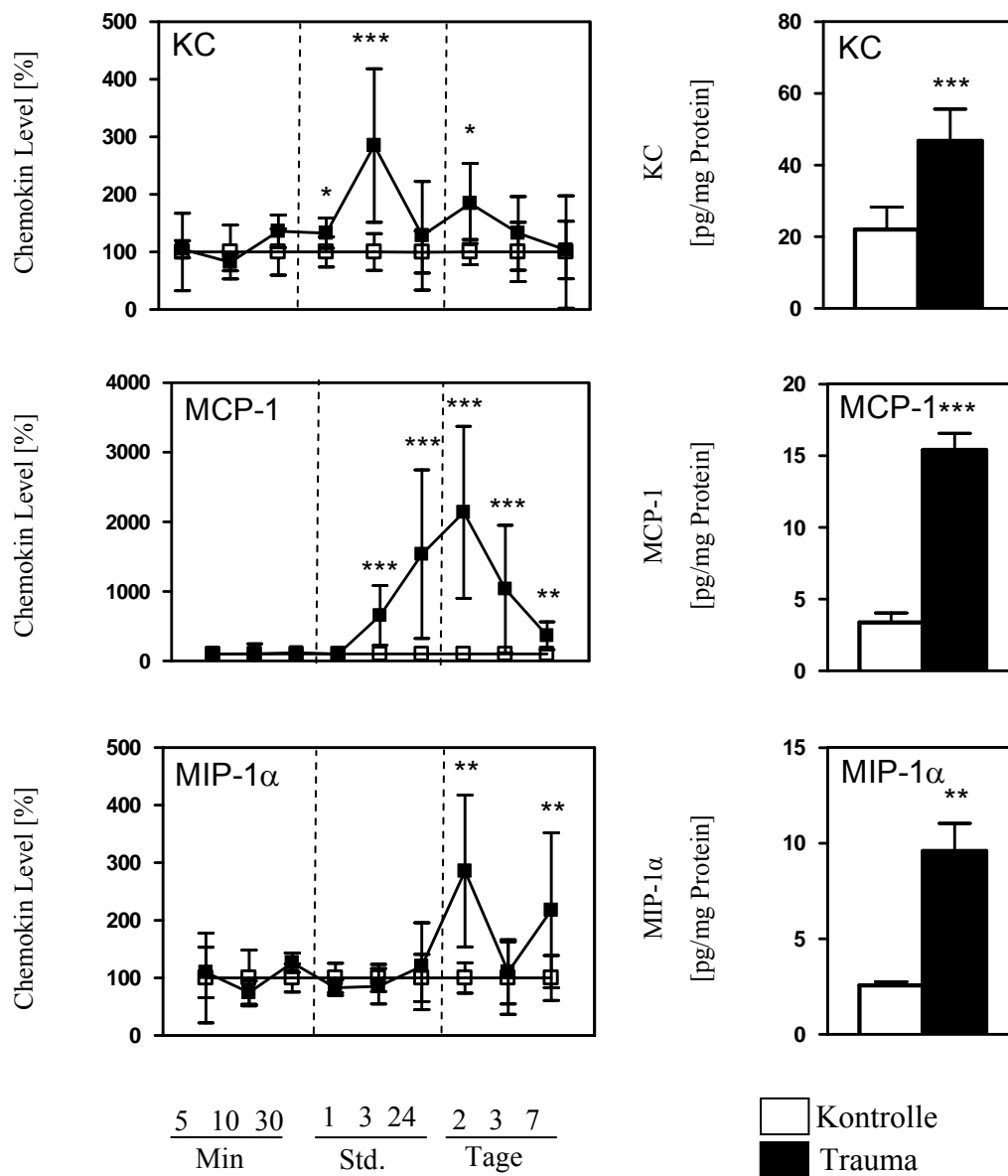


Abb. 3-29: Chemokinmengen in den homogenisierten Muskeln.

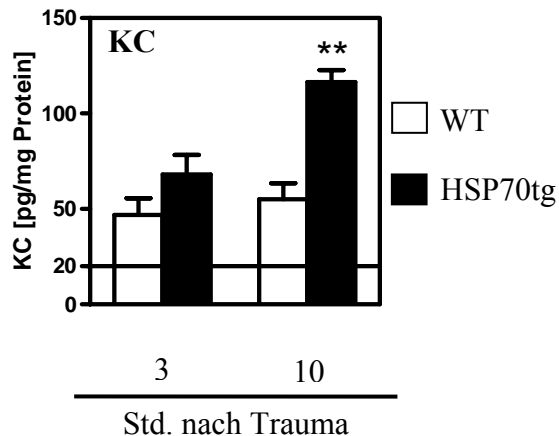
In der Abbildung links dargestellt als Zeitkinetik von 5 Minuten bis zu sieben Tagen als

prozentuale Änderung im Vergleich zum Kontrollmuskel. Rechts sind die Absolutwerte der Chemokine für drei Stunden bei KC und MCP-1 und für 48 Stunden bei MIP1- α bezogen auf die Gesamtproteinmenge des Muskels dargestellt. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ bezogen auf den jeweiligen Kontrollmuskel. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Konfidenzintervall aus zwei unabhängigen Experimenten mit vier bis acht Tieren.

In Abbildung 3-28 ist ein signifikanter Anstieg der Chemokinmengen im Muskel nach Trauma über die Zeit zu sehen. Bereits nach drei Stunden erreichten die Mengen an KC und MCP-1 signifikant erhöhte Werte. Der schnelle Anstieg der KC Produktion war nach drei Stunden dabei bereits auf seinem Höhepunkt von fast 300 % des Kontrollmuskels. Die Menge an MCP-1 stieg etwas langsamer an und erreichte ihr Maximum erst nach 48 Stunden. Dabei wurden allerdings massiv erhöhte Werte (mehr als 20-fach) im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Für MIP-1 α war erst nach 48 Stunden ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Danach sank die MIP-1 α Menge rasch wieder auf Werte des Kontroll-Muskels und stieg erneut bei sieben Tagen an. Sowohl die späte Einwanderung der dendritischen Zellen als auch der frühe Anstieg der Granulozyten und Makrophagen im traumatisierten Muskel (Abb. 3-25 und 3-27) spiegeln sich dabei in der Chemokinproduktion im Muskel wieder. Zum Vergleich für die prozentuale Darstellung in den Abbildungen (Abb. 3-29) auf der linken Seite wurden die Absolutmengen für drei Stunden bei KC und MCP-1 aufgetragen. Diese Werte wurden auf die Gesamtmenge an Protein im Homogenat bezogen. Bei MIP-1 α wurde der 48 Stunden Zeitpunkt gewählt, da vorher keine deutliche Erhöhung sichtbar war. Die sequentielle Expression der verschiedenen Chemokine korrelierte mit der Reihenfolge der Leukozytenarten während der Infiltration.

Da im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, dass HSP70 eine immunmodulierende Wirkung hat, wurden erste Versuche durchgeführt, um zu überprüfen inwieweit HSP70 einen Einfluss auf das Migrationsverhalten hat. Dazu wurden HSP70 transgene Mäuse (HSP70 überexprimierend) und Wildtyp Mäuse traumatisiert, nach drei und zehn Stunden die Muskeln präpariert und homogenisiert. Das Muskelhomogenat wurde auf Chemokine hin im ELISA untersucht.

A



B

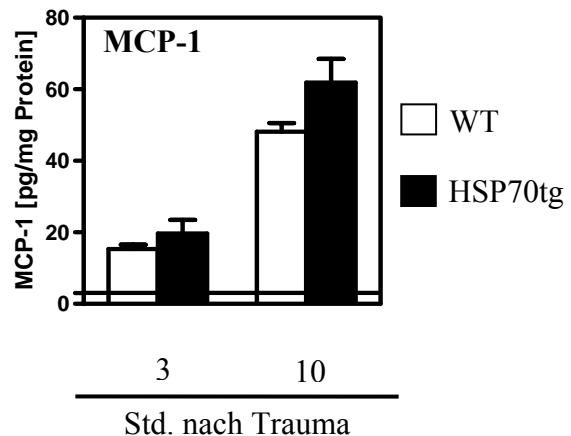


Abb. 3-30: Vergleich der Chemokinproduktion im Muskel von Wildtyp- und transgenen Tieren.

Es wurden HSP70 transgene Tiere (HSP70tg) und BALB/c Mäuse (WT) traumatisiert und das Muskelhomogenat auf Chemokine untersucht. Dargestellt ist der Vergleich zwischen transgenen Tieren und Wildtyp in pg/mg Gesamtprotein. Die horizontale Linie gibt den Chemokinwert eines unbehandelten Muskels sowohl für HSP70tg als auch Wildtyp Tiere an. Es sind jeweils vier Tiere als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. ** $p < 0,01$ Students t-Test gegen den Wildtypen.

In Abbildung 3-29 ist der schnelle Anstieg von KC und MCP-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu sehen. Vergleicht man nun die transgenen Tiere mit den Wildtypen, so erkennt man bei KC (Abb. 3-30A), dass der Anstieg in den ersten drei Stunden nur leicht gesteigert ist. Zehn Stunden nach Trauma ist die Menge an KC in den transgenen Muskeln allerdings doppelt so groß wie in den Wildtyp-Tieren, während KC in den Wildtyp-Tieren nicht weiter ansteigt. Bei MCP-1 ist zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren kein deutlicher Unterschied erkennbar. Beide steigen, wie in Abbildung 3-29 zu sehen, stark an. Eine leichte Tendenz für eine stärkere Chemokinproduktion in den transgenen Muskeln ist zu erkennen. Innerhalb von 10 Stunden nach Trauma vermittelt transgen überexprimiertes HSP70 eine verstärkte Produktion von KC im traumatisierten Muskel im Vergleich zu Muskeln von Wildtyp-Tieren.

3.3.6 Chemokinsynthese in Muskelzellen

In den vorherigen Versuchen konnte eine starke Chemokinproduktion im traumatisierten Gewebe nachgewiesen werden. Da in gesundem Muskelgewebe nur sehr wenig residente Leukozyten vorliegen, welche die Chemokine produzieren könnten, ist die Quelle der hohen Chemokinkonzentration im Muskel nach Trauma unklar. Um die Frage zu klären, ob möglicherweise die Muskelzellen selbst für die frühe Chemokinproduktion verantwortlich

sind, wurden *in vitro* Kulturen von Mausmyozyten (C2C12) untersucht. Dazu wurden Mausmyozyten von ihrer Kulturschale abgeschabt und dabei zerstört. Der entstehende *Debris* wurde auf frische Myozyten gegeben und die Chemokinmenge im Überstand nach verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA gemessen.

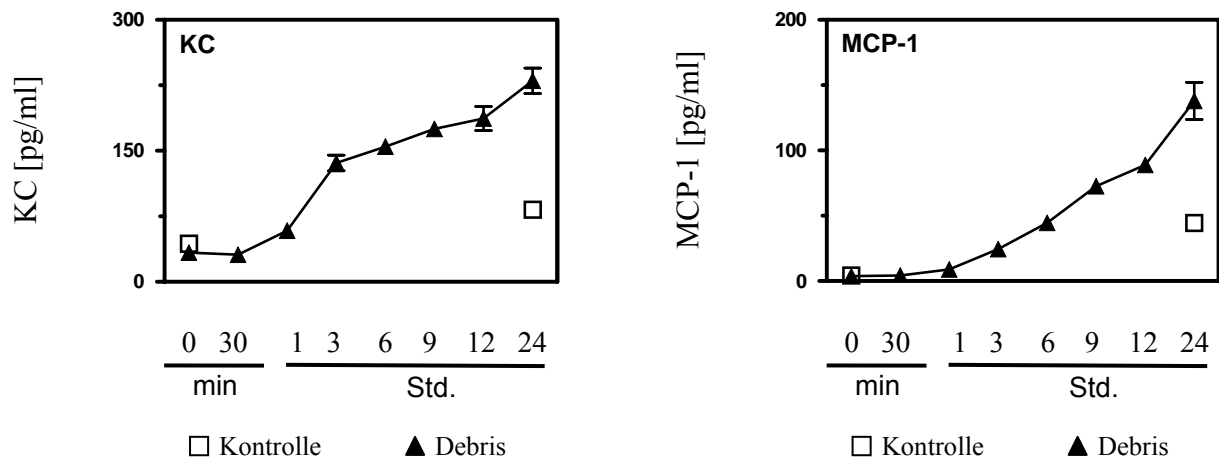


Abb. 3-31: Zeitkinetik der Chemokinproduktion der Myozyten nach Zugabe von *Debris*
 Differenzierte Myozyten wurden für die indizierten Zeitpunkte mit *Debris* inkubiert und die Chemokinproduktion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten in Triplets \pm Standardabweichung.

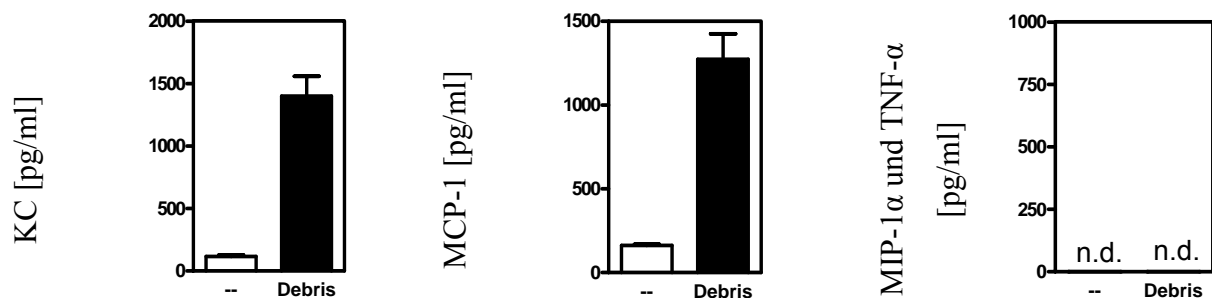


Abb. 3-32: Darstellung der Chemokinproduktion nach 24 Stunden
 Mausmyozyten wurden für 24 Stunden mit *Debris* inkubiert und die Chemokinproduktion im Überstand mittels ELISA bestimmt. Es ist ein deutlicher Anstieg der Chemokinproduktion zu sehen, während MIP-1 α und TNF- α nicht nachweisbar waren. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten in Triplets \pm Standardabweichung.

Es war ein deutlicher Anstieg in der Chemokinsynthese durch intakte Myozyten nach Zugabe von *Debris* zu beobachten. Dies bedeutet, dass die Myozyten in der Lage waren, nach Kontakt mit geschädigten Muskelzellen, die Chemokine KC und MCP-1 zu produzieren (Abb. 3-31). In den Abbildungen 3-31 ist der Verlauf der Chemokinproduktion über die Zeit zu sehen. Bereits eine Stunde nach Zugabe der *Debris* stieg die KC Sekretion deutlich an. Zum drei Stunden Zeitpunkt war in den isolierten Myozyten ein maximaler Anstieg der Sekretion zu sehen. Danach flachte der Anstieg etwas ab. Die Chemokinkonzentration in den Überständen der Kontrollen (weiß) stieg innerhalb der 24 stündigen Inkubation nur leicht an. Die Sekretion

von MCP-1 startete etwas später als die von KC, blieb dafür aber über den gesamten Zeitraum in einem steilen Anstieg. Auch hier stieg die Kontrolle nur leicht über den Zeitraum von 24 Stunden an. In Abbildung 3-32 sind die Absolutwerte nach 24 Stunden zu sehen. Dies verdeutlicht den Anstieg sehr deutlich. Die Messungen für MIP-1 α und TNF- α waren über die gesamte Zeitspanne negativ. Myozyten können Chemokine im Muskel nach Trauma oder nach Stimulation durch *Debris* sezernieren. Sie könnten damit bei KC und MCP-1 mitverantwortlich für die hohen Chemokinwerte im traumatisierten Muskel sein. MIP-1 α und TNF- α wurden auf Stimulation mit *Debris* nicht sezerniert.

4. Diskussion

Durch die fortschreitende medizinische Versorgung ist es heute möglich, immer mehr Menschen zu helfen, die vor einigen Jahren noch nicht therapierbar gewesen wären. Allerdings bleibt das Trauma, vor allem ausgelöst durch Unfälle im Straßenverkehr, die Haupttodesursache der unter 45-jährigen Bevölkerung [1]. Dadurch, dass der Hauptteil der Patienten nicht mehr an den Akutfolgen des Traumas verstirbt, sondern durch spätere Komplikationen [3], ist es ein wichtiger Schritt, die Auslöser dieser Komplikationen näher zu charakterisieren. Dabei wird das Weichteiltrauma im klinischen Alltag meist vernachlässigt. Erst in wenigen Studien wurde seine Bedeutung untersucht [124]. Vor allem nachdem in einem Tiermodell nachgewiesen wurde, dass nicht die Anwesenheit von Mikroorganismen selbst, sondern der Weichteilschaden für eine Infektionsanfälligkeit verantwortlich ist [116], muss bei der Einteilung von Verletzungsmustern dem Weichteiltrauma mehr Bedeutung zugemessen werden [9]. Die Wirkung des Traumas zeigt sich aufgrund verbesserter medizinischer Versorgung und eines gut ausgebauten Rettungssystems nicht mehr im initialen Versterben der Patienten, sondern durch Komplikationen, die durch eine progressive Hemmung des adaptiven Immunsystems gekennzeichnet sind [4].

4.1 Veränderung der Immunantwort durch das Weichteiltrauma

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des lokalen Weichteiltraumas auf die Entwicklung einer Immunsuppression und -modulation untersucht. Dabei lag der Fokus sowohl auf der Untersuchung möglicher immunmodulierender Faktoren, die durch den Gewebeschaden freigesetzt werden, sowie der Änderung der zellulären Homeostase. Die lokale Wirkung eines Weichteiltraumas wurde zunächst mit Hilfe von Wundflüssigkeit von Patienten, die sich einer elektiven Operation unterziehen mussten, untersucht. Bei den ausgewählten Hüftoperationen werden große Teile von Muskelgewebe während der Freilegung des Knochens zerstört. In der Drainageflasche sammelt sich sowohl Blut, das das zerstörte Gewebe passiert, als auch Gewebeflüssigkeit die durch die Zerstörung freigesetzt wird. Zur Darstellung einer systemischen Wirkung wurde den Patienten zum selben Zeitpunkt nach der Operation peripheres Blut abgenommen. Bereits drei Stunden nach der Operation zeigten sich die MNC der Wundflüssigkeit deutlich in der LPS-induzierten TNF- α Synthese gehemmt. Die Hemmung der MNC aus der Wundflüssigkeit bestand in demselben Maße auch

sechs Stunden nach der Operation. Dieser Effekt der aus Wundflüssigkeit isolierten MNC konnte auf eine deutlich reduzierte Aktivität der Monozyten, den Hauptproduzenten von TNF- α unter den MNC, zurückgeführt werden. Die Wirkung war allerdings, wahrscheinlich aufgrund des begrenzten Traumas und der Ableitung eines ausgeschütteten Faktors in die Drainageflasche, nicht systemisch sondern nur lokal nachweisbar. Die MNC aus dem Blut der Patienten reagierten bei allen Zeitpunkten der Abnahme vergleichbar zu Kontrollkulturen gesunder Probanden. Die Suppression der Zellen aus der Drainageflasche wurde bereits durch geringe Mengen an Wundflüssigkeit (Abs. 3.1.4) auf PBMNC gesunder Probanden übertragen und scheint damit eine Wirkung der in der Wundflüssigkeit enthaltenen Faktoren zu sein. Eine Stimulation mit Serum der Patienten zur Untersuchung eines systemischen Faktors zeigte allerdings keine Wirkung auf die LPS-induzierte TNF- α Antwort von PBMNC aus gesunden Probanden. Ein systemisch freigesetzter Faktor, wie er im Falle des Ubiquitins bei Polytraumapatienten beschrieben wurde [39, 43], konnte so nicht nachgewiesen werden. Allerdings wird bei den hier verwendeten Patienten auch ein deutlich geringeres Trauma als bei einem Polytrauma untersucht und ein Teil eines freigesetzten Faktors wird durch die Drainageflasche direkt abgeleitet. Ein größerer Weichteilschaden ohne Drainage könnte diesen Faktor auch systemisch akkumulieren und damit eine Wirkung des peripheren Serums ergeben. Eine Immunsuppression aufgrund des Traumas ist demnach lokal bereits direkt nach dem Trauma zu beobachten und lässt sich auf PBMNC gesunder Probanden übertragen.

Bekanntere Mediatoren hingegen, welche die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung durch Monozyten inhibieren können, sind IL-10, IL-6 und Transforming Growth Faktor β (TGF- β) [125-127]. Die Gegenwart von Wundflüssigkeit verstärkt nicht die IL-10 Freisetzung nach Stimulation der MNC mit LPS. Daher ist IL-10 wahrscheinlich nicht für die beobachtete Hemmung der MNC durch die Wundflüssigkeit verantwortlich.

Bereits geringe Mengen an Wundflüssigkeit (Abschnitt 3.1.4) waren in der Lage, eine deutliche Chemokinproduktion zu induzieren. Nach 48 Stunden Inkubation mit Wundflüssigkeit, aber nicht mit dem Serum der Patienten, zeigten PBMNC gesunder Probanden eine hohe Sekretion an MCP-1 und IL-8. Das IL-8 ist zwar in der Wundflüssigkeit selbst vorhanden und wird beschrieben [25], allerdings wurde diese initial vorhandene Menge bei der Stimulation der Zellen stark verdünnt. Es handelte sich demnach um eine Neusynthese von IL-8 und nicht um eine Verdünnung des initial vorhandenen IL-8 aus der Wundflüssigkeit. Andere Zytokine, wie TNF- α , welche die Chemokinantwort induzieren könnten, waren in der Wundflüssigkeit selbst nicht nachweisbar. Eine Induktion der Chemokinantwort durch geringe Mengen an IL-8 oder nicht nachweisbaren Spuren anderer

Zytokine, wie TNF- α , in der Wundflüssigkeit würden vermutlich auch schneller als nach 48 Stunden zu einer Chemokinproduktion führen. Nach 24 Stunden ist allerdings kaum IL-8 und kein TNF- α nach Stimulation mit der Wundflüssigkeit nachweisbar. Erst im späteren Verlauf der Stimulation werden Chemokine gebildet.

Die Freisetzung von Chemokinen könnte jedoch die beobachtete Änderung der Homeostase zur Folge haben (Abb. 3-4). Dabei ist die schnelle Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark und darauf folgende Einwanderung in traumatisiertes Gewebe eine sehr frühe Folge eines Traumas [46, 48]. Diese Neutrophilen sorgen für eine erste Verteidigung gegen bakterielle Infektionen, allerdings führt die Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies aus den Granulozyten auch zu Gewebeerstörung und kann damit zu Organversagen führen [128]. Diese schnelle Erhöhung der Granulozytenanzahl ist auch direkt nach dem Trauma in Wundflüssigkeit und peripherem Blut zu beobachten. Die Anwesenheit und Induktion von IL-8 durch Wundflüssigkeit führt zu der Vermutung, dass IL-8 im traumatisierten Gewebe freigesetzt und im System verdünnt wird. Die Granulozyten folgen diesem Gradienten und wandern in das geschädigte Gewebe ein [129]. Die schnelle und deutliche Freisetzung von MCP-1, ein Chemokin, das Monozyten und dendritische Zellen anlockt, führt zum Einstrom von Zellen welche, die Geweberegeneration unterstützen [47]. Die Verringerung der Monozytenanzahl in der Wundflüssigkeit könnte damit erklärt werden, dass die Monozyten dem MCP-1 Gradienten folgen, in das traumatisierte Gewebe einwandern und dort verbleiben, um die Wundheilung und Modulation des geschädigten Gewebes zu beginnen. Dadurch gelangen sie nur in geringerer Anzahl in die Wundflüssigkeit. Ein Anheften der Monozyten in der Drainageflasche konnte als Ursache der verringerten Anzahl ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.1.6 und Abb. 3-9B). Der Anstieg der Gesamtleukozytenzahl ist mit einer massiven Freisetzung von Zellen aus dem Knochenmark erklärbar. Vor allem die prozentual stark vertretenden Granulozyten haben einen großen Anteil an dieser Veränderung. Die leichte Abnahme der T-Lymphozyten könnte aus dem Blutverlust und folgender Volumengabe während der Operation und daraus resultierenden Verdünnung resultieren.

4.2. Der immunmodulierende Faktor stammt aus den Zellen selbst

Bei der Betrachtung der Immunsuppression zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Traumaintensität und dem Ausmaß der Immunsuppression [36] nach Trauma. Dabei sind die Entzündungsreaktionen direkt nach einem Trauma nicht auf Bakterien zurückzuführen; sie werden daher als „sterile Entzündung“ bezeichnet [60] und müssen durch endogene Faktoren

ausgelöst werden. Da durch Proteinase K Verdau (Abb. 3-6) gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem Chemokininduzierenden Faktor in der Wundflüssigkeit um ein Protein handelt, wurden die ubiquitär vorhandenen Hitzeschockproteine untersucht. Durch das Trauma werden die intrazellulären Proteine nach Nekrose der Zellen freigesetzt und gelangen direkt in das umgebene Gewebe und die extrazelluläre Flüssigkeit. Proteine mit einem hohen Anteil der intrazellulären Proteinkonzentration von $> 2\%$ [88] sind die HSP. Die Menge an freigesetzten HSP korrelierte dabei mit der Größe des Weichteilschadens (Tab. 3-3). Die Handhabung der Wundflüssigkeit hatte nachweislich keinen Einfluss auf den Gehalt an HSP (Abs. 3.1.6). Andere untersuchte intrazelluläre Proteine, wie das in großer Menge vorhandene Myoglobin (Abs. 3.2.1), hatten keinen Effekt auf die LPS-vermittelte TNF- α Antwort. Von den beiden untersuchten HSP Formen, HSP60 und HSP70, zeigte vor allem das HSP70 denselben Effekt wie die Wundflüssigkeit auf MNC gesunder Probanden. Die parallele Inkubation von HSP70 mit LPS ergab eine Reduktion in der LPS-vermittelten IL-6 und TNF- α Antwort, wie sie bei einer beginnenden Immunsuppression zu erwarten ist. Das HSP60 zeigte bei der parallelen Gabe keinen Effekt auf die TNF- α Freisetzung und nur einen geringen stimulatorischen Effekt bei der IL-6-induktion.

Die Chemokin-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Zellen zur Wundheilung durch Chemokininduktion bildet eine erste Abwehr gegen eindringende Bakterien. Allerdings ist die Abwehr Gram-negativer Bakterien von einer adäquaten TNF- α Antwort abhängig [130]. Diese TNF- α Antwort wird durch HSP70, im Gegensatz zum HSP60, gehemmt und könnte damit bei einem polytraumatisierten Patienten zu einer unkontrollierten Verbreitung Gram-negativer Bakterien führen. Die überschießende Reaktion auf eine bakterielle Infektion direkt nach dem Trauma könnte durch das HSP70 allerdings ebenfalls gehemmt werden. Diese reduzierte Reaktion auf einen starken LPS-Stimulus kann im Falle eines letalen LPS/Endotoxinschock protektiv wirken. Die Mortalität von Ratten durch eine LPS Injektion wurde durch eine HSP70-Injektion zehn Minuten vor der LPS Injektion deutlich verringert [102]. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob der hemmende Effekt auf die LPS-induzierte TNF- α Freisetzung durch eine Vorinkubation der MNC mit HSP verstärkt werden kann. Dabei zeigte sich jedoch ein gegensätzlicher Effekt (Abb. 3-15). Im Gegensatz zur Hemmung bei paralleler Gabe der HSP zeigte eine 24-stündige Vorinkubation eine deutliche Erhöhung der TNF- α und IL-6 Freisetzung. Dieser Effekt wurde bei beiden HSP Formen gleichermaßen beobachtet. Beide HSP sensibilisieren die PBMNC soweit, dass eine bis zu 300 % stärkere LPS-induzierte TNF- α und IL-6 Antwort auftritt. Der Organismus würde also auf eine spätere Infektion nach dem Trauma schneller und sensibler reagieren. Es zeigt sich also ein

gegenläufiger Effekt zwischen Hemmung der LPS-induzierten TNF- α Sekretion und der Sensibilisierung der MNC für einen LPS-Stimulus. In Abhängigkeit des Zeitpunktes einer Infektion wird die Immunantwort verändert. Die erste inflammatorische Antwort wird gehemmt und könnte im Falle einer überschießenden proinflammatorischen Reaktion vor weiterem Schaden schützen [102]. Auf diese Weise könnte auch ein weiterer Gewebeschaden durch die zu rasche Stimulation neutrophiler Granulozyten vermieden werden. Auf der anderen Seite kann das HSP den Organismus für eine Infektion sensibilisieren, sofern diese erst nach dem Trauma auftritt.

Die Fähigkeit beider HSP, eine IL-8-induktion auszulösen, untermauert die Beteiligung der HSP an der Wundheilung durch die Regulation der Infiltration von Leukozyten. Es zeigte sich allerdings, dass die HSP die Chemokininduktion nicht direkt auslösen. Sowohl die Wundflüssigkeit, mit initial vorhandenem IL-8, als auch die rekombinanten HSP geben keine direkte proinflammatorische Antwort. TNF- α wird nur in Verbindung mit einem LPS Stimulus induziert und wie oben beschrieben in seiner Antwort moduliert. In dieser Arbeit konnte vielmehr gezeigt werden, dass die Bildung von IL-8 über einen unbekanntem Faktor induziert wird. Die Sekretion von IL-8 beginnt erst 20-24 Stunden nach HSP Stimulus (Abb. 3-13). Die gezeigten IL-8-Stimulationen beziehen sich auf eine 48 Stunden Inkubation. Werden die Überstände jedoch nach 24 Stunden ausgetauscht (Mediumwechsel), so produzieren auch diejenigen Zellen IL-8, die nur 24 Stunden mit dem Überstand aus einer vorhergehenden Stimulation inkubiert wurden. Die Zellen, bei denen der Überstand nach 24 Stunden durch frisches Medium ersetzt wurde, haben eine Restproduktion, erreichen allerdings nicht die IL-8 Werte der kompletten 48 Stunden Inkubation. Es muss demnach durch die HSP ein löslicher Faktor gebildet werden, welcher in den Überstand freigesetzt wird und die IL-8 Sekretion einleitet. Die erste Inkubationsspanne von 20 Stunden wird zur Bildung dieses Faktors benötigt.

Das Ergebnis, dass LPS die Freisetzung von HSP aus PBMNC erhöhen kann [131], unterstützt die Annahme, dass die HSP ein Teil der sogenannten Alarmine sind [85]. Sie wirken damit als ein Teil der Signalkette zwischen Alarminen und PAMPs, die sich gegenseitig regulieren, um die gestörte Homeostase nach Gewebeschaden und bakterieller Infektion wieder auszugleichen, und den Organismus sowohl vor überschießenden Reaktionen initial nach zu Trauma schützen, als auch für spätere Infektionen zu sensibilisieren. In den endogenen HSP liegt demnach sowohl ein pro- wie auch anti-inflammatorisches Potenzial. Eine übermäßige Freisetzung von solchen Alarminen könnte bei einem sehr großen Weichteilschaden wie bei einem Polytrauma einen Anteil an

den postoperativen Komplikationen haben. Sollte eine ausgedehnte Inflammation auftreten, könnten sie das Bild des SIRS verstärken, während ihre Fähigkeit zur Immunsuppression zu einer Infektionsanfälligkeit führen könnte.

4.3.1 Mechanismen der Modulation durch HSP

Die LPS-induzierte TNF- α Sekretion wird durch HSP beeinflusst. Es ergab sich somit die Frage, ob das Bindungsverhalten des LPS an die Monozyten durch HSP verändert wird. Dabei zeigte sich, dass die Bindung von FITC-markiertem LPS an Monozyten zwar nachweisbar war, allerdings ließ sich das Bindungsverhalten nicht durch Inkubation mit HSP verändern. Erst durch Zugabe oder Vorinkubation mit hohen Dosen an LPS konnte das Bindungsverhalten moduliert werden. Da die Signalkaskade des LPS über die Bindung an CD14 und die darauf folgende Assoziation an den TLR4/MD-2 Komplex aktiviert wird, wurde die Expression von TLR4 und CD14 nach HSP und LPS Stimulation gemessen. Dabei konnte keine Änderung in der CD14-Expression festgestellt werden. Die beobachtete Steigerung der TLR4-Expression durch HSP70 wird durch LPS erst ab einer Dosis von 1 ng/ml erreicht. Die Suppression der LPS-induzierten TNF- α Produktion durch parallele Gabe von HSP70 liegt daher nicht in einer Störung des LPS Bindungsverhaltens an Monozyten begründet.

HSP60 verfügt über eine spezifische Bindungsstelle für LPS [132], und es wird von einer Bindungsstelle für Makrophagen berichtet [133]. Diese Bindungsstelle für LPS scheint aber nicht mit der TNF- α Sekretion durch LPS zu interagieren. Es konnte keine Änderung des Bindungsverhaltens bei Co-Stimulation mit HSP60 beobachtet werden. Für HSP70 ist keine Bindungsstelle für LPS beschrieben. Dennoch ist HSP70 in der Lage, die LPS-induzierte TNF- α Sekretion bei paralleler Inkubation zu verringern. Da HSP70 die Bindung von LPS an Monozyten nicht verringert und damit den Erkennungsprozess auf der Zelloberfläche nicht stört, muss eine Modulation der LPS Antwort im Signalweg nach der Rezeptorbindung liegen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass exogenes HSP70 sehr schnell in die Zelle aufgenommen wird [134]. Dabei ist unklar, ob HSP70 nach Internalisierung in die Zelle direkt mit dem NF- κ B Signalweg interagiert und diesen hemmen kann oder ein anderer Mechanismus vorliegt. Es stellt jedoch eine Möglichkeit dar, die HSP70-vermittelte Hemmung der TNF- α Sekretion bei paralleler Gabe zu erklären (Abb. 3-15).

Die beobachtete Erhöhung der TNF- α und IL-6 Sekretion durch Vorinkubation mit beiden HSP-Formen kann nicht mit einem erhöhten Bindungsverhalten des LPS an Monozyten

erklärt werden (Abb. 3-19/20). Wie auch bei der Co-Stimulation wurde weder das Bindungsverhalten geändert noch die Expression des Rezeptors CD14 erhöht.

Bei der LPS-induzierten Signalkaskade nimmt der TLR4 eine Schlüsselrolle ein. Er bindet an den LPS-gekoppelten CD14 und leitet das Signal anschließend in die Zelle weiter. Eine Steigerung der Expression des TLR4 auf Monozyten nach LPS Stimulation wurde beschrieben [135]. Eine Erhöhung des TLR4 auf den Monozyten durch LPS konnte auch hier beobachtet werden. Es ist aber bekannt, dass LPS-stimulierte Monozyten tolerant werden und auf einen zweiten LPS Stimulus deutlich vermindert reagieren [136]. Daher scheint eine Erhöhung des TLR4 durch LPS Stimulation widersinnig. Studien über CD14 und TLR4 in Lipid Raft Modellen zeigen jedoch, dass ein Ungleichgewicht in diesen Mikrodomänen zu einem Versagen der Toleranz von Makrophagen auf einen zweiten LPS Stimulus führen könnte [137]. Diese Lipid Rafts enthalten diverse Proteine, so auch endogenes HSP70, und sorgen für eine Interaktion zwischen Zelloberfläche und Molekül. Exogenes HSP70 bindet ebenfalls an diese Mikrodomänen und stimuliert Maus-Makrophagen zur schnellen Endozytose [101]. Da eine Erhöhung des TLR4 auf HSP70 Stimulation gefunden wurde, liegt der Schluss nahe, dass die Vorinkubation mit HSP70 das LPS-Signal über eine Veränderung in der Proteinstruktur dieser Lipid Raft Domänen modulieren könnte. Die Vorinkubation mit HSP60 hatte ebenfalls eine Erhöhung der LPS-induzierten TNF- α Sekretion zur Folge. Für HSP60 konnte allerdings keine Änderung in der TLR4 bzw. CD14 Expression oder der Bindung von LPS an Monozyten nachgewiesen werden. Daher muss hier ein noch unbekannter Weg der Interaktion zwischen HSP60 und dem LPS-Signalweg vorliegen.

4.3.2 Die Verwendung rekombinanter Proteine

Die HSP werden zu den so genannten Alarminen gezählt [85]. Da diese Gruppe an Molekülen einige Signalwege mit Pathogen-assoziierten Molekülen teilt, ist es wichtig nachzuweisen, dass es sich bei den verwendeten rekombinanten Proteinen um hochaufgereinigte und kontaminationsfreie Produkte handelt. Die verwendeten rekombinanten Proteine wurden aus E.coli isoliert und könnten daher mit Endotoxinen belastet sein. Eine Inkubation mit LPS ergibt selbst bei geringen Dosen eine deutliche TNF- α Sekretion aus PBMNC. Beide verwendete HSP-Formen waren allerdings alleine nicht in der Lage TNF- α zu induzieren. Dieses wurde auch in der Literatur beschrieben [97, 98]. Dass HSP60 die Interferon- α (IFN- α) Freisetzung im Gegensatz zu LPS erhöhen kann, zeigt dabei einen unterschiedlichen

Signalweg zwischen den Molekülen auf [100]. Dennoch sind die HSP in der Lage, eine LPS-induzierte TNF- α oder IL-6 Sekretion zu modulieren.

Zum Nachweis, dass es sich bei den beschriebenen Effekten der rekombinanten Proteine um eine Wirkung des Proteins selbst und nicht um einen Kontaminations-Effekt handelt, wurden die Proteine vor der Stimulation verdaut und damit zerstört. Dadurch müsste sich eine Aufhebung des Effektes ergeben und nur die Wirkung einer potentiellen Kontamination sichtbar sein. Ein Verdau der rekombinanten Proteine ergab eine fast vollständige Aufhebung der IL-8 Produktion. Enthaltene Spuren von LPS hätten dabei bereits nach 24 Stunden eine deutliche IL-8 Sekretion ausgelöst, da LPS bereits in sehr geringen Dosen zu einer deutlichen Stimulation von PBMNC führt. Die leichte Stimulation der PBMNC, welche nach dem Verdau noch beobachtet wurde, könnte entweder in einem unvollständigen Verdau begründet sein, oder aber einer geringen Kontamination des Proteins, die allerdings keinen starken Einfluss auf die beobachteten Sekretion hatte.

Die unseren Ergebnissen widersprechenden Studien, in denen eine Toleranz von Zellen auf HSP Stimulation gefunden wurde [138], sind nicht mit dieser Arbeit vergleichbar, da dort THP-1 Zelllinien und nicht primäre Zellen verwendet wurden und zusätzlich mit sehr hohen Dosierungen an LPS (1 μ g/ml anstatt 1ng/ml) gearbeitet werden musste. Bei einer anderen Studie wurde eine Toleranz von PBMNC auf LPS nach HSP Stimulation gefunden [139]. Hier wurde allerdings eine HSP-Aufreinigung benutzt, die alleine in der Lage war, TNF- α zu induzieren. Diese Induktion führt zu der Annahme einer möglichen Kontamination, da die hier verwendeten rekombinanten Proteine alleine keinerlei TNF- α Stimulation zeigten. Das in dieser Arbeit benutzte HSP zeigte aufgrund folgender Ergebnisse keinen Kontaminationseffekt.

1. Die Messungen im LAL Test ergaben einen Endotoxinwert unterhalb von 2 EU/mg Protein.
2. Die verwendeten HSP Präparationen zeigten keine TNF- α Aktivierung ohne zusätzlichen LPS Stimulus, und es ergab sich innerhalb der ersten 24 Stunden keine IL-8 Freisetzung, wie sie bei geringsten Dosen von LPS zu beobachten ist.
3. Die Vorinkubation mit HSP ergab keine Toleranzentwicklung auf LPS.
4. Die TLR4 Expression wird von HSP70 in gleicher Weise erhöht wie eine hohe LPS-Dosis. Eine derartige LPS Menge als Kontamination würde aber sowohl TNF- α als auch IL-8 nach 24 Stunden freisetzen.
5. Die Verwendung von kontaminiertem HSP zeigt ein anderes Stimulationsmuster (Abb. 3-17).

6. Die stimulatorische Fähigkeit der HSP ließ sich durch Proteinase K-Verdau aufheben.

Der Nachweis, dass die beobachteten Wirkungen der Wundflüssigkeit auf das HSP zurückzuführen sind, konnte nur indirekt über die Verwendung rekombinanter Proteine erbracht werden. Der direkte Nachweis über die Blockade der Bindungsstelle des Proteins durch einen inhibierenden Antikörper konnte nicht durchgeführt werden, da kein inhibierender Antikörper zur Verfügung stand. Alle HSP bindenden Antikörper, die getestet wurden, hatten entweder selbst eine starke stimulatorische Wirkung oder waren mit unbekanntem Substanzen kontaminiert. Diese Kontaminationen führten zu einer derart starken Stimulation der PBMNC, dass ein Effekt der rekombinanten Proteine selbst nicht mehr sichtbar war. Der Versuch das HSP aus der Wundflüssigkeit herauszupräzipitieren gelang ebenfalls nicht, da eine Bindung des HSP nur unter Verwendung eines milden Detergens an die zur Verfügung stehenden Antikörper gelang. Bereits Spuren der getesteten Detergentien waren entweder toxisch für die Zellen oder stimulierten diese extrem stark.

Zusammenfassend zeigte sich die Wirkung des untersuchten Weichteiltraumas lokal in einer bereits drei Stunden nach Operationsende eintretenden Suppression der Monozyten. Die LPS-induzierte TNF- α Freisetzung war stark gehemmt. Eine systemische Wirkung konnte aufgrund des begrenzten Traumas nicht gefunden werden. Die Chemokinfreisetzung auf Wundflüssigkeitsstimulation und die Hemmung der LPS-induzierten TNF- α Freisetzung könnten durch intrazellulär vorhandene und durch Nekrose freigesetzte HSP vermittelt werden, da die rekombinanten Proteine im Falle des HSP70 dieselben und im Falle des HSP60 teilweise dieselben Stimulationsmuster wie die Wundflüssigkeit zeigten. Für die lokale Wirkung eines Weichteiltraumas ist damit eine Beteiligung der HSP sehr wahrscheinlich geworden. Sie zählen zu den Alarminen und sind in der Lage, die Homeostase zu beeinflussen und die Immunmodulation nach Trauma zu vermitteln. Ihre Beteiligung an postoperativen Komplikationen nach schwerem Trauma ist sehr wahrscheinlich. Systemisch könnten sie nach einem Polytrauma wirken, da dort ein deutlich größerer Weichteilschaden besteht und damit die Verdünnung im System nicht mehr so ausschlaggebend wäre. Ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten machen sie zu einem Faktor, der weiter untersucht werden sollte, um die Vorgänge nach Gewebeschaden besser zu verstehen.

4.4 Definiertes Weichteiltrauma in der Maus

Die Betrachtung des Traumas *in vivo* im Menschen zeigte die Freisetzung von immunmodulierenden Faktoren. Diese Mediatoren konnten *in vitro* in der Zellkultur untersucht werden und auf primäre Zellen angewandt werden. Eine Betrachtung der Vorgänge im geschädigten Gewebe selbst konnte nicht im humanen System erfolgen. Aus diesem Grunde wurde ein Mausmodell etabliert. Dazu wurde das Modell von Crisco et. al [121] auf die Maus übertragen und angepasst. Dabei wird ein frei fallendes Gewicht auf den m. gastrocnemius (Wadenmuskel) der Maus appliziert. Es zeigte sich mikroskopisch ein deutlicher Muskelschaden und es war eine deutliche Ödembildung im MRT sichtbar. Mithilfe dieses Modells wurde zuerst überprüft, ob eine Freisetzung von HSP aus dem traumatisierten Gewebe direkt nachgewiesen werden konnte. Die HSP60 Menge im traumatisierten Muskel war trotz gleicher Proteinmengen im Homogenat verringert und stützt daher die Aussage, dass HSP freigesetzt werden. Ein Extrahieren des Ödems und der Wundflüssigkeit konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da ein geschlossenes Weichteiltrauma untersucht werden sollte und eine weitere Schädigung des Muskels ausgeschlossen werden musste. Ebenso wie beim Menschen konnte auch hier kein systemischer Nachweis für HSP gefunden werden, da das hier induzierte Trauma ebenso wie der Schaden nach ausgewählten Operationen zu gering war. Die Vermutung ist dabei, dass die freigesetzten HSP im System bis unter die Nachweisgrenze verdünnt wurden.

Da beschrieben wird, dass die Muskelregeneration mit dem Einstrom neutrophiler Zellen beginnt [46, 48], wurden die traumatisierten Muskeln geschnitten, mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mithilfe des LSM untersucht. Es zeigte sich hier ein rascher Einstrom von Granulozyten in das deutlich sichtbar geschädigte Gewebe. Nachfolgend wurden an Tag vier Makrophagen und an Tag sieben dendritische Zellen gefunden. Die geordnete Muskelstruktur baute sich mikroskopisch dabei zum Tag sieben wieder auf. Dieses entsprach auch der makroskopischen Betrachtung beim Präparieren der Muskeln. Die Einwanderung der Zellen aufgrund des Traumas ist deutlich sichtbar und nachweisbar. Bei der Betrachtung der quantifizierten Zellzahlen, die in den Muskel einwandern (Abs. 3.3.4), fällt auf, dass die an Tag eins erscheinenden Granulozyten einen sehr schnellen Anstieg und einen sehr schnellen Abfall in der Zellzahl zeigen. An Tag sieben sind kaum noch Granulozyten nachweisbar. Die Granulozyten verhalten sich dabei entsprechend der vorher sichtbaren prozentualen Verteilung. Die Makrophagen wandern erst ab dem vierten Tag in großer Zahl ein und fallen danach sehr rasch wieder ab. Bei den Makrophagen fällt auf, dass ihre Gesamtanzahl deutlich

schneller abnimmt als erwartet. Zusätzliche Messungen zeigten, dass zwischen 60 % und 70 % der dendritischen Zellen an Tag sieben auch für F4/80 positiv waren (nicht gezeigt in Abs. 3.3.4). Dieses ist normalerweise ein Marker für Makrophagen. Die Anzahl der dendritischen Zellen steigt erst am vierten Tag an und bleibt auf einem vergleichsweise hohen Wert bis zum Tag sieben. Der starke Abfall der Makrophagen von Tag vier zu Tag sieben kann dabei entweder apoptotisch bedingt sein, oder aber die Makrophagen transformieren in dendritische Zellen. Ein apoptotischer Untergang der Makrophagen wäre möglich, allerdings erklärt dieser nicht die hohe Anzahl an F4/80 positiven dendritischen Zellen. Die Umwandlung von Makrophagen in dendritische Zellen *in vitro* ist seit längerem beschrieben [51], allerdings zeigt sich bei Untersuchungen im murinen System auch, dass es unterschiedliche Monozytenpopulationen gibt, die in der Lage sind, sich *in vivo* im Gewebe in dendritische Zellen zu transformieren [140, 141]. Aufgrund dieser Studien und der Beobachtung, dass auch hier dendritische Zellen zu einem hohen Prozentsatz für F4/80 positiv sind, liegt der Schluss nahe, dass die Abnahme der Makrophagen nicht apoptotischer Natur ist, sondern eine Transformation in dendritische Zellen stattfindet. Die im Muskel nachgewiesenen dendritischen Zellen können demnach entweder aus dem systemischen Kreislauf stammen und dem gebildeten MIP-1 α Gradienten folgen, oder könnten erst im Gewebe gebildet worden sein [52, 141].

Da HSP im humanen System in der Lage waren, große Mengen an Chemokinen in PBMNC zu induzieren, wurden HSP70 überexprimierende Mäuse nach demselben Protokoll traumatisiert und mit Wildtypmäusen verglichen. Es ergab sich allerdings im Infiltrationsmuster kein eindeutiger Unterschied zu den Wildtypen. Hier wären weitere Versuche mit unterschiedlichen Zeitpunkten von Nöten, um eine Veränderung der Infiltration durch endogenes HSP70 zu untersuchen.

4.5 Chemokinproduktion im traumatisierten Muskel

Um zu untersuchen, inwieweit die Infiltration in den traumatisierten Muskel mit einer Chemokininduktion korreliert, wurde die Chemokinproduktion im traumatisierten Muskel mittels PCR und ELISA untersucht. Es zeigte sich dabei, dass sowohl in der PCR wie auch im ELISA eine deutliche erhöhte Chemokinproduktion sichtbar war. Das Trauma löste sehr schnell eine erhöhte Expression der mRNA für MCP-1 und MIP-1 α aus. Eine Erhöhung der Proteine selbst war im ELISA ebenfalls nachweisbar. Dabei zeigte sich eine hohe Korrelation in der Reihenfolge der Chemokinbildung mit den einwandernden Zellen (Abs. 3.3.5). Zuerst

kommt es bereits nach weniger als einer Stunde zu einem Anstieg des KC (Maushomologon zum menschlichen IL-8). Dieses KC ist in erster Linie chemoattraktiv für Granulozyten. Sein zeitlicher Verlauf stimmt dabei mit der Wanderung der Granulozyten überein [57, 59, 61]. Es wurde ein schneller Anstieg von KC bis 24 Stunden nach Trauma und danach ein starker Abfall beobachtet. Diesem Gradienten folgte auch die Quantifizierung der Granulozyten. Die etwas spätere Bildung von MCP-1 korreliert dabei mit der Einwanderung der Makrophagen und das erst nach zwei Tagen gebildete MIP-1 α könnte für die Einwanderung oder Differenzierung in dendritische Zellen verantwortlich sein. Bei Versuchen mit HSP70 transgenen Mäusen (HSP70 Überexpression) wurde für KC bereits sehr früh ein höherer Chemokinwert erreicht als in Wildtypmäusen. Eine Tendenz zeigte sich bereits nach drei Stunden und nach zehn Stunden war eine signifikante Erhöhung um 100% gegenüber den Wildtypmäusen festzustellen. Dieses würde mit der Induktion von IL-8 durch HSP in der primären humanen Zellkultur übereinstimmen. Bei der Untersuchung von MCP-1 zeigte sich bei diesen frühen Zeitpunkten erst eine leichte Tendenz. Für eine genauere Betrachtung reichten die Anzahl der Versuche und die untersuchten Chemokine/Zeitpunkte noch nicht aus. Jedoch scheint die HSP70 Überexpression einen Einfluss auf die Chemokinproduktion zu haben.

Durch die Untersuchung einer Myozytenzelllinie sollte zusätzlich noch eine weitere Frage geklärt werden, inwieweit die Muskelzellen selbst auf den Schaden benachbarter Zellen reagieren und für eine initiale Freisetzung von Chemokinen sorgen könnten. So wird diskutiert, ob ein Zell-Zell-Kontakt zwischen MNC und Endothelzellen zur Chemokinfreisetzung führt [142, 143], oder aber die Muskelzellen selbst in der Lage sind, die erste Stufe der Wundheilung und Zellinfiltration zu starten [144]. In Abschnitt 3.3.6 wurden differenzierte Myozyten mit zerstörten Muskelzellfragmenten (*Debris*) inkubiert. Dabei kam es bereits nach einer Stunde zu einer deutlichen Induktion von KC im Überstand, die sich im zeitlichen Verlauf abschwächte. Die Proteinmenge stieg dabei allerdings weiter an. Für MCP-1 ergab sich ein etwas späterer Anstieg, allerdings blieb diese Produktion konstant hoch. MIP-1 α und TNF- α konnten nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass Myozyten in der Lage sind, die Chemokinsynthese ohne residierende Zellen des Immunsystems zu starten, denn innerhalb der Zelllinie gibt es keine residierenden Leukozyten. Die Myozyten scheinen in der Lage zu sein auf den Stimulus von zerstörten Muskelzellen hin die Chemokinsynthese zu induzieren. Die erste Induktion zur Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen käme damit von den Muskelzellen selbst und erst die Infiltration oder Differenzierung der dendritischen Zellen würde durch Zellen des

Immunsystems vermittelt. Die Ausschüttung von KC und MCP-1 wäre ausreichend, um den Einstrom von Granulozyten und Monozyten zu vermitteln. Dieser Mechanismus wäre äußerst effizient und schnell. In Verbindung mit dem Ergebnis, dass die Muskeln der HSP70 überexprimierenden Mäusen eine gesteigerte KC Produktion haben, ergibt sich eine Signalkaskade zur Infiltration des geschädigten Gewebes. Die intrazellulären Proteine werden durch den Muskelschaden oder die Zerstörung der Myozyten freigesetzt. Der Kontakt dieser endogenen Faktoren mit den ungeschädigten Muskelzellen führt zu der sofortigen Freisetzung von Chemokinen, um die Wundheilung zu starten und eine Immunabwehr aufzubauen. Dabei haben die endogen vorhandenen HSP einen steigernden Einfluss auf die Chemokinsynthese. Dadurch liegt der Schluss nahe, dass sie zumindest auch einen Anteil an der Auslösung dieses Mechanismus haben. Dabei bleibt ungeklärt, ob die zerstörten Muskelzellen alleine das Signal durch freigesetzte Faktoren induzieren, oder aber auch geschädigte Muskelzellen vor ihrem Untergang an der Signalkaskade der Chemokinfreisetzung teilhaben. Es kommt damit jedenfalls zu einer sequenziellen Freisetzung der Chemokine und würde damit eine sequentielle Infiltration von Leukozyten zur Folge haben. Diese Abfolge entspricht der beobachteten Reihenfolge der Infiltration und führt zu einer sinnvollen Kaskade. Der in der Literatur beschriebene schnelle Einstrom von Granulozyten [46, 48] wird von den Muskelzellen selbst ausgelöst und durch das transgen überexprimierte HSP noch weiter gesteigert. Damit ist eine erste Abwehr gegen bakterielle Infektionen gewährleistet. Im Anschluss werden Monozyten und Makrophagen durch die MCP-1 Freisetzung rekrutiert und starten die Wundheilung [49]. Sie entfernen Zelltrümmer und remodulieren das geschädigte Muskelgewebe [46]. Die in das geschädigte Gewebe einwandernden Monozyten differenzieren dabei erst im Gewebe zu Makrophagen und haben einen deutlichen Einfluss auf die späteren Phasen der Proliferation und Differenzierung des Muskels [51, 52]. Es wurde in diesem System keine Freisetzung von MIP-1 α durch die Myozyten gefunden. Die erst relativ späte Einwanderung der dendritischen Zellen könnte demnach entweder erst durch die infiltrierten Leukozyten ausgelöst werden, oder aber die eingewanderten Monozyten differenzieren durch einen später freigesetzten Stimulus zu dendritischen Zellen. In einer Arbeit im murinen System konnte gezeigt werden, dass Monozyten nicht nur befähigt sind, in Makrophagen zu differenzieren, sondern auch in inflammatorische dendritische Zellen, welche TNF- α und induzierbares Stickstoffoxid produzieren können [54]. Die genaue Funktion von in Gewebe einwandernden dendritischen Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Annahme, dass dendritische Zellen bei Wundheilung das Immunsystem modulieren, konnte bei mechanischem Muskeltrauma noch nicht nachgewiesen werden. Eine Studie zeigte

allerdings die Einwanderung und Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen nach intramuskulärer DNA Vakzinierung [57].

Folgende Hypothese lässt sich aus den oben beschriebenen Erkenntnissen ableiten:

Nach dem Gewebeschaden im Muskel kommt es zu einem ersten Impuls zur Wundheilung und Infiltration von Leukozyten ins geschädigte Gewebe. Dabei scheinen endogene Alarmine wie die HSP eine deutliche Rolle zu spielen. Die Infiltration der dendritischen Zellen oder Transformation der Monozyten in dendritische Zellen wird erst danach ausgelöst. Die oben diskutierten Effekte des HSP kommen erst nach der Infiltration der Zellen zum Tragen und führen zu einer weiteren Chemokinausschüttung und Modulation der Immunantwort innerhalb des traumatisierten Gewebes. Dabei kommt es zuerst zu einer Immunsuppression, die den Effekt der Gewebeerstörung durch Granulozyten verringern könnte, und danach zu einer Sensibilisierung des Organismus auf bakterielle Infektionen zur Abwehr einer möglichen Infektion.

5 Zusammenfassung

Das Polytrauma und der daraus entstehende Gewebeschaden führen beim Patienten zu einer Monozytendeaktivierung und damit zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Die Regeneration des Gewebes nach Trauma wird durch einen Einstrom von Leukozyten initiiert. Die Pathomechanismen für die Monozytendeaktivierung und die Infiltration der Leukozyten sind insbesondere in Bezug auf das Weichteiltrauma nicht bekannt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Aspekte der Monozytendeaktivierung mit Hilfe von Wundflüssigkeit aus Patienten nach elektiven Operationen untersucht. Die Vorgänge innerhalb des geschädigten Gewebes wurden mit Hilfe eines Mausmodells für mechanisches Weichteiltrauma untersucht. Im humanen Weichteiltrauma ergab sich eine lokale Freisetzung von intrazellulären Proteinen wie Myoglobin und Hitze-Schock-Protein (HSP) 60 und HSP70 in die Wundflüssigkeit. Dabei konnte eine zeitabhängige Modulation der Monozyten-Funktion durch die HSP beobachtet werden. HSP70 vermittelt eine Deaktivierung von Monozyten im Fall einer parallel stattfindenden Stimulation mit bakteriellen Stimuli wie LPS und könnte so an der Monozytendeaktivierung nach Polytrauma beteiligt sein. Sowohl HSP60 als auch HSP70 induzierten eine Hypersensibilisierung der Mono-Nukleären-Zellen (MNC), sofern sie nicht parallel zum LPS Stimulus sondern 24 Stunden zuvor auf MNC einwirken konnten. HSP60 und HSP70 alleine stimulierten MNC zur Freisetzung verschiedener Chemokine. Dazu war allerdings die Bildung eines weiteren Faktors notwendig, da die Freisetzung der Chemokine erst nach 48 Stunden erfolgte und sich die stimulatorische Wirkung durch den Überstand nach 24 Stunden auf unbehandelte Zellen transferieren ließ. Im Tiermodell konnte die sequentielle Produktion von Chemokinen mit der Infiltration der Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen korreliert werden. Die Beobachtung, dass HSP70 transgene Mäuse erhöhte Mengen der Chemokine im Muskel nach Trauma exprimierten, unterstützt die Annahme, dass HSP die Produktion von Chemokinen vermitteln können. Weiterhin wurden die Myozyten als Sensoren für Zellschaden identifiziert und dabei setzen sie Chemokine für die initiale Infiltration von Granulozyten und Makrophagen frei.

Das Weichteiltrauma führt zur Freisetzung von intrazellulärem HSP. Bei einer ausreichend großen Schädigung ist ein Übertritt der HSP in die Zirkulation denkbar, wobei Monozyten systemisch moduliert werden könnten. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Zielzellen zur Produktion von Chemokinen anzuregen, können HSP als Regulatoren der Migration von Chemokinen fungieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Baker, C.C., et al., *Epidemiology of trauma deaths*. Am J Surg, 1980. **140**(1): p. 144-50.
2. Liener, U.C., F. Gebhard, and L. Kinzl, [*Trauma surgery 2020. Developments in the past--challenges and perspectives for the future. I: Trauma surgery management*]. Unfallchirurg, 1999. **102**(5): p. 413-20.
3. Ertel, W. and O. Trentz, [*Polytrauma and multi-organ failure syndrome. Definition--pathophysiology--therapy*]. Zentralbl Chir, 1994. **119**(3): p. 159-67.
4. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
5. Sala, D., et al., *Epidemiologic aspects of pediatric multiple trauma in a Spanish urban population*. J Pediatr Surg, 2000. **35**(10): p. 1478-81.
6. Ruchholtz, S., et al., [*Early mortality in polytrauma. A critical analysis of preventable errors*]. Unfallchirurg, 1994. **97**(6): p. 285-91.
7. Hildebrand, F., et al., *Management of polytraumatized patients with associated blunt chest trauma: a comparison of two European countries*. Injury, 2005. **36**(2): p. 293-302.
8. Meier, J. and O. Habler, [*The polytrauma patient in the intensive care unit*]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2007. **42**(10): p. 724-30.
9. Oestern, H.J. and K. Kabus, [*The classification of the severely and multiply injured--what has been established?*]. Chirurg, 1997. **68**(11): p. 1059-65.
10. Friedl, H.P. and O. Trentz, [*Multiple trauma: definition, shock, multiple organ failure*]. Unfallchirurgie, 1992. **18**(2): p. 64-8.
11. Faist, E., et al., *Multiple organ failure in polytrauma patients*. J Trauma, 1983. **23**(9): p. 775-87.
12. van Nieuwenhoven, E.J., et al., *Clinical relevance of sepsis scores*. Langenbecks Arch Surg, 1998. **383**(1): p. 11-4.
13. Nuytinck, H.K., et al., *Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study*. Arch Surg, 1988. **123**(12): p. 1519-24.
14. Guillou, P.J., *Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma*. Lancet, 1993. **342**(8865): p. 217-20.
15. Venet, F., et al., *Regulatory T cell populations in sepsis and trauma*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 523-35.
16. Grob, P.J., M. Holch, and W. Brunner, [*Post-traumatic/postoperative immune deficiency syndrome*]. Schweiz Med Wochenschr, 1987. **117**(13): p. 471-80.
17. Regel, G., et al., [*Multiple organ failure. Reflection of generalized cell damage of all organs following severe trauma*]. Unfallchirurg, 1991. **94**(10): p. 487-97.
18. Donnelly, S.C. and C. Robertson, *Mediators, mechanisms and mortality in major trauma*. Resuscitation, 1994. **28**(2): p. 87-92.
19. Baue, A.E., *The horror autotoxicus and multiple-organ failure*. Arch Surg, 1992. **127**(12): p. 1451-62.
20. Goris, R.J., *Pathophysiology of shock in trauma*. Eur J Surg, 2000. **166**(2): p. 100-11.
21. Cavaillon, J.M., et al., *Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS*. J Endotoxin Res, 2005. **11**(5): p. 311-20.
22. Rangel-Frausto, M.S., et al., *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study*. Jama, 1995. **273**(2): p. 117-23.
23. Bone, R.C., *The pathogenesis of sepsis*. Ann Intern Med, 1991. **115**(6): p. 457-69.

24. Bone, R.C., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.* Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
25. Hoch, R.C., et al., *Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production.* Crit Care Med, 1993. **21**(6): p. 839-45.
26. Martin, C., et al., *Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma.* Crit Care Med, 1997. **25**(11): p. 1813-9.
27. Yao, Y.M., et al., *The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure.* Inflamm Res, 1998. **47**(5): p. 201-10.
28. Berger, D., *[Infection without infection focus--clinical relevance of bacterial translocation].* Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1997. **114**: p. 941-6.
29. Moore, F.A., et al., *Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon.* J Trauma, 1996. **40**(4): p. 501-10; discussion 510-2.
30. Hietbrink, F., et al., *Trauma: the role of the innate immune system.* World J Emerg Surg, 2006. **1**: p. 15.
31. Hershman, M.J., et al., *Comparison of antibody response with delayed hypersensitivity in severely injured patients.* Arch Surg, 1989. **124**(3): p. 339-41.
32. Fagon, J.Y., et al., *Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay.* Am J Med, 1993. **94**(3): p. 281-8.
33. Mokart, D., et al., *Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer.* Br J Surg, 2002. **89**(11): p. 1450-6.
34. Polk, H.C., Jr., et al., *A systematic study of host defense processes in badly injured patients.* Ann Surg, 1986. **204**(3): p. 282-99.
35. Munoz, C., et al., *Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis.* J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1747-54.
36. Majetschak, M., et al., *The extent of traumatic damage determines a graded depression of the endotoxin responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with blunt injuries.* Crit Care Med, 1999. **27**(2): p. 313-8.
37. Heagy, W., et al., *Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients.* Shock, 2000. **14**(3): p. 271-6; discussion 276-7.
38. Volk, H.D., et al., *Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies.* Behring Inst Mitt, 1991(88): p. 208-15.
39. Majetschak, M., et al., *Regulation of whole blood tumor necrosis factor production upon endotoxin stimulation after severe blunt trauma.* J Trauma, 1997. **43**(6): p. 880-7.
40. Borgermann, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha production in whole blood after cardiopulmonary bypass: downregulation caused by circulating cytokine-inhibitory activities.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **124**(3): p. 608-17.
41. Hashiguchi, N., et al., *Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients.* J Trauma, 2001. **50**(1): p. 102-7.
42. Pittet, J.F., et al., *Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival.* J Trauma, 2002. **52**(4): p. 611-7; discussion 617.
43. Majetschak, M., et al., *Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness.* Blood, 2003. **101**(5): p. 1882-90.

44. Fielding, R.A., et al., *Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. R166-72.
45. Hernandez, L.A., et al., *Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury*. Am J Physiol, 1987. **253**(3 Pt 2): p. H699-703.
46. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(2): p. R345-53.
47. Pimorady-Esfahani, A., M.D. Grounds, and P.G. McMenamin, *Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle*. Muscle Nerve, 1997. **20**(2): p. 158-66.
48. Kirov, S.M., J.J. Shepherd, and K.D. Donald, *Intraoperative and postoperative changes in peripheral white blood cell counts: the contribution of stress*. Aust N Z J Surg, 1979. **49**(6): p. 738-42.
49. DiPietro, L.A., *Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells*. Shock, 1995. **4**(4): p. 233-40.
50. Chin, D., et al., *What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)?* Br J Plast Surg, 2004. **57**(3): p. 215-21.
51. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
52. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
53. Muller Kobold, A.C., et al., *Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality*. Intensive Care Med, 2000. **26**(7): p. 883-92.
54. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
55. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
56. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
57. Sumida, S.M., et al., *Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1334-42.
58. Janeway, C.A., Jr.; Travers; Walport; Shlomchik, *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed. 2005: Churchill Livingstone.
59. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
60. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
61. Muehlstedt, S.G., et al., *Systemic and pulmonary effector cell function after injury*. Crit Care Med, 2002. **30**(6): p. 1322-6.
62. Summan, M., et al., *Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis*. J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(5): p. 237-45.
63. Warren, G.L., et al., *Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(5): p. C1031-6.
64. Ratajczak, M.Z., et al., *Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles*. Stem Cells, 2003. **21**(3): p. 363-71.
65. Polla, B.S., *A role for heat shock proteins in inflammation?* Immunol Today, 1988. **9**(5): p. 134-7.
66. Lindquist, S. and E.A. Craig, *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet, 1988. **22**: p. 631-77.
67. Lindquist, S., *The heat-shock response*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1151-91.

68. Frostegard, J., et al., *Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein*. *Atherosclerosis*, 1996. **121**(1): p. 93-103.
69. Ferm, M.T., et al., *Induction of human hsp60 expression in monocytic cell lines*. *Int Immunol*, 1992. **4**(3): p. 305-11.
70. Simon, M.M., et al., *Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(3): p. 926-33.
71. Schmidt, J.A. and E. Abdulla, *Down-regulation of IL-1 beta biosynthesis by inducers of the heat-shock response*. *J Immunol*, 1988. **141**(6): p. 2027-34.
72. Kukreja, R.C., et al., *Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(6 Pt 2): p. H2213-9.
73. Panjwani, N.N., L. Popova, and P.K. Srivastava, *Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs*. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2997-3003.
74. Xu, Q., et al., *Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(5): p. 1089-97.
75. Feinstein, D.L., et al., *Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(30): p. 17724-32.
76. Lin, K.M., et al., *Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation*. *Circulation*, 2001. **103**(13): p. 1787-92.
77. Hotchkiss, R., et al., *Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(6 Pt 2): p. R1447-57.
78. Saad, S., et al., *Protective effect of heat shock pretreatment with heat shock protein induction before hepatic warm ischemic injury caused by Pringle's maneuver*. *Surgery*, 1995. **118**(3): p. 510-6.
79. Donnelly, T.J., et al., *Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?* *Circulation*, 1992. **85**(2): p. 769-78.
80. Suzuki, K., et al., *In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(7): p. 1645-50.
81. Vanden Hoek, T.L., *Preconditioning and postresuscitation injury*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(4 Suppl): p. S172-5.
82. Aksoyek, S., et al., *Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation*. *Shock*, 2002. **18**(5): p. 476-80.
83. Kume, M., et al., *Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury*. *J Lab Clin Med*, 1996. **128**(3): p. 251-8.
84. Sun, J.Z., et al., *Late preconditioning against myocardial stunning. An endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(1): p. 388-403.
85. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 1-5.
86. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. *Science*, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
87. Rock, K.L. and H. Kono, *The Inflammatory Response to Cell Death*. *Annu Rev Pathol*, 2007.

88. Basu, S., et al., *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway*. *Int Immunol*, 2000. **12**(11): p. 1539-46.
89. Vabulas, R.M., et al., *Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(33): p. 31332-9.
90. Theriault, J.R., H. Adachi, and S.K. Calderwood, *Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8604-11.
91. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
92. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 558-61.
93. Basu, S., et al., *CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin*. *Immunity*, 2001. **14**(3): p. 303-13.
94. Binder, R.J., D.K. Han, and P.K. Srivastava, *CD91: a receptor for heat shock protein gp96*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(2): p. 151-5.
95. Kol, A., et al., *Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(1): p. 13-7.
96. Habich, C., et al., *The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 569-76.
97. Gao, B. and M.F. Tsan, *Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22523-9.
98. Bausinger, H., et al., *Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(12): p. 3708-13.
99. Gao, B. and M.F. Tsan, *Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 174-9.
100. Osterloh, A., et al., *Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4669-80.
101. Wang, R., et al., *Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1636-42.
102. Kustanova, G.A., et al., *Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats*. *Cell Stress Chaperones*, 2006. **11**(3): p. 276-86.
103. Soltys, B.J. and R.S. Gupta, *Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells*. *Cell Biol Int*, 1997. **21**(5): p. 315-20.
104. Srivastava, P.K., et al., *Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world*. *Immunity*, 1998. **8**(6): p. 657-65.
105. Tamura, Y., et al., *Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations*. *Science*, 1997. **278**(5335): p. 117-20.
106. Kol, A., et al., *Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(4): p. 571-7.
107. Flohe, S.B., et al., *Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype*. *J Immunol*, 2003. **170**(5): p. 2340-8.

108. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 435-42.
109. Zheng, H., et al., *Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6731-5.
110. Millar, D.G., et al., *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1469-76.
111. Feige, U. and I.R. Cohen, *The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice*. Springer Semin Immunopathol, 1991. **13**(1): p. 99-113.
112. Xu, Q., et al., *Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 14-20.
113. Hochleitner, B.W., et al., *Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 617-23.
114. van Eden, W., R. van der Zee, and B. Prakken, *Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 318-30.
115. Dybdahl, B., et al., *Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 685-90.
116. Kalicke, T., et al., *Influence of a standardized closed soft tissue trauma on resistance to local infection. An experimental study in rats*. J Orthop Res, 2003. **21**(2): p. 373-8.
117. Marber, M.S., et al., *Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1446-56.
118. Trost, S.U., et al., *Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 855-62.
119. Engvall, E. and P. Perlman, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
120. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
121. Crisco, J.J., et al., *A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology*. Am J Sports Med, 1994. **22**(5): p. 702-10.
122. Lawyer, F.C., et al., *Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus*. J Biol Chem, 1989. **264**(11): p. 6427-37.
123. Neumeister, B., Liebrich, *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 2003, Urban&Fischer: München/Jena.
124. Hansis M, N.C., Arens S, *Infektfördernde Faktoren bei knöchernen Eingriffen am Unterschenkel - erste Ergebnisse einer prospektiven Multizenterstudie*. Hefte zu "Der Unfallchirurg", 1998(272): p. 286-287.
125. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
126. Schindler, R., et al., *Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF*. Blood, 1990. **75**(1): p. 40-7.
127. Tsunawaki, S., et al., *Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 260-2.

128. Botha, A.J., et al., *Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure*. J Trauma, 1995. **39**(3): p. 411-7.
129. Ben-Baruch, A., D.F. Michiel, and J.J. Oppenheim, *Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11703-6.
130. Fiers, W., *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level*. FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 199-212.
131. Davies, E.L., et al., *Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(1): p. 183-9.
132. Habich, C., et al., *Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1298-305.
133. Habich, C., et al., *Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 115-20.
134. Arnold-Schild, D., et al., *Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3757-60.
135. Jiang, Q., et al., *Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3541-4.
136. Flohe, S., et al., *Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock*. Cytokine, 1999. **11**(10): p. 796-804.
137. Cuschieri, J., J. Billigren, and R.V. Maier, *Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1289-97.
138. Aneja, R., et al., *Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7184-92.
139. Kilmartin, B. and D.J. Reen, *HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli*. Eur J Immunol, 2004. **34**(7): p. 2041-51.
140. Liao, H.F., et al., *Macrophages derived from bone marrow modulate differentiation of myeloid dendritic cells*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(1): p. 104-11.
141. Varol, C., et al., *Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 171-80.
142. Smith, C.W., *Leukocyte-endothelial cell interactions*. Semin Hematol, 1993. **30**(4 Suppl 4): p. 45-53; discussion 54-5.
143. Smith, R.E., et al., *Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(5): p. 612-9.
144. De Rossi, M., et al., *Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation*. Int Immunol, 2000. **12**(9): p. 1329-35.