

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Posttraumatisch verminderte Expression von TLR2 ist mit
verringertem Phagozytose-Leistung und gestörter Reifung von
Monozyten assoziiert**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lukas Schimunek

aus Lindenfels

Frankfurt am Main, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Posttraumatisch verminderte Expression von TLR2 ist mit
verringertem Phagozytose-Leistung und gestörter Reifung von
Monozyten assoziiert**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lukas Schimunek

aus Lindenfels

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

Referent: PD Dr. med Nils Wagner

Vorsitzender: Prof. Dr. Fabian Finkelmeier

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Mathias Weigert

Korreferent: Prof. Dr. Mark Lehnert

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassungen	6
Zusammenfassung in englischer Sprache.....	6
Zusammenfassung in deutscher Sprache	8
2. Abkürzungsverzeichnis	11
3. Übergreifende Zusammenfassung	13
3.1. Einleitung.....	13
3.2. Darstellung der Publikation.....	17
4. Publikation.....	30
Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen.....	30
Bisherige Präsentation der Forschungsergebnisse auf Kongressen.....	32
Bisherige Posterpräsentationen der Forschungsergebnisse auf Kongressen ...	33
Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation.....	34
Publikation „Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model”	36
5. Literaturverzeichnis der übergreifenden Zusammenfassung	61
6. Anhang.....	64
7. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8. Schriftliche Erklärung.....	68
9. Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Zusammenfassungen

Zusammenfassung in englischer Sprache

Trauma is one of the leading causes of death in Germany and worldwide for individuals under 55 years old. Traumatic tissue injury leads to the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), which induces an inflammatory cascade, and which is considered to diminish organ function. This leads to organ failure and subsequently to multiple organ failure (MOF). In most cases, the inflammatory response is appropriate in its extent, and the injury-induced inflammation is a well-coordinated network of immune cells, cytokines, and chemokines, which leads to tissue resolution. However, if that network is out of balance, the inflammatory response can become augmented by a feed-forward loop of inflammation and tissue damage. If this process becomes systemic, it is called systemic inflammatory response syndrome (SIRS). On the other hand, there is a counterpart to SIRS, namely compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). However, an overshooting CARS can impair the post-traumatic inflammatory course. Both deranged responses can lead to organ dysfunction, nosocomial infections and, ultimately, death. Thus, a well-balanced, early post-traumatic immune response is crucial for a good outcome.

Monocytes are major players in the primary immune response after trauma as well as after infection. Being equipped with multiple pattern recognition receptors (PRRs), notably Toll-Like Receptors (TLRs), Monocytes are capable of recognizing pathogens and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and subsequently neutralize them. Moreover, monocytes are able to present PAMPs to the adaptive immune system via Major Histocompatibility Complex Class II (MHC-II) molecules and act therefore as a cellular link between the innate and the adaptive immune system. TLR2 is one of the main receptors for PAMPs of gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, the major bacterium of post-traumatic wound infection and nosocomial infection.

There is still no consensus on the impact of traumatic injury onto the function of monocytes and their expression pattern of PRRs and MHC-II molecules after trauma. There are reports of impaired TLR2 expression on monocytes after trauma, as well as reports of constant and even increased expression of TLR2 on monocytes in trauma patients. The data is also inconsistent regarding the post-traumatic phagocytic function of monocytes. While some of the previous studies reported an increased number of circulating monocytes with preserved

phagocytic capability in the early post-traumatic course of trauma patients compared to healthy volunteers, other studies showed a diminished phagocytic function of monocytes after trauma. Furthermore, there are contradictory results on the monocytic ability to release pro-inflammatory cytokines, such as Interleukin (IL)-1 β or Tumor necrosis factor (TNF)- α .

Taken together, there is still a tremendous dissent across recent studies and a lack of both combining different aspects of monocytic functionality such as phenotyping or functional assays and observing them over an extended period of time. The dissent of recent studies might be due to the uncontrollable nature of polytrauma like the varying pattern of injuries, the first care at the scene of accident, the passing time until the arrival at the emergency room and the final care of the injuries. All this can lead to different reactions of the immune system and therefore different post-traumatic outcomes.

Therefore, we sought to eliminate the mentioned variables and conducted a well-controlled porcine large animal polytrauma study to investigate the post-traumatic functionality of porcine monocytes over a time course 72h after trauma. Additionally, and in contrast to previous studies, we combined phenotyping of monocytes (TLR2 and MHC-II [SLA-DR]) with a functional phagocytosis assay and analyzed their direct association in an independent assay.

Peripheral blood was withdrawn before (-1h) and directly after induction of polytrauma (PT) (0h), as well as 3.5h, 5.5h, 24h and 72h after trauma. The expression of MHC-II (SLA-DR) and TLR2 on porcine monocytes were investigated. Additionally, the phagocytizing activity of porcine monocytes was measured. Furthermore, for mechanistic purposes, blood samples from 10 healthy pigs were exposed to a TLR2-neutralizing antibody and subsequently to *S. aureus* particles before phagocytizing activity of the monocytes was measured.

The number of CD14⁺ monocytes of all circulating leukocytes remained constant during the observational time period, while the percentage of CD14⁺H(S)LA-DR⁺ monocytes was significantly decreased directly, 3.5h and 5.5h after trauma. The percentage of TLR2⁺ expressing cells out of all monocytes significantly decreased directly, 3.5h and 5.5h after trauma. The percentage of phagocytizing monocytes decreased immediately and remained lower during the first 3.5h after trauma but increased after 24h. Antagonizing TLR2 significantly decreased the phagocytizing activity of monocytes.

Both decreased percentage of activated as well as TLR2 expressing monocytes persisted as long as the reduced phagocytosis was observed. Moreover, neutralizing TLR2 led to a reduced capability of phagocytosis as well. Therefore, we assume reduced TLR2 expression to be responsible for the decreased phagocytizing capacity of circulating monocytes in the early posttraumatic phase.

Zusammenfassung in deutscher Sprache

Trauma ist in Deutschland und weltweit eine der häufigsten Todesursache bei Personen unter 55 Jahren. Eine traumatische Verletzung von Gewebe führt zur Freisetzung von sogenannten damage-associated molecular patterns (DAMPs), die eine Entzündungskaskade auslösen, welche die Organfunktion negativ beeinträchtigt. Dies führt bei anhaltender Entzündung zunächst zu Organdysfunktion, was im weiteren Verlauf zu Organversagen führt und im Spätstadium im multiplen Organversagen (MOF) enden kann. In den meisten Fällen ist die inflammatorische Antwort des Immunsystems auf das Trauma adäquat und entspricht einem gut koordinierten Netzwerk von Immunzellen, Zytokinen und Chemokinen, welches zur Wiederherstellung des geschädigten Gewebes führt. Wenn dieses Netzwerk jedoch nicht im Gleichgewicht ist, kann die Entzündungsreaktion durch eine sogenannte feed-forward-loop von Inflammation und Gewebeschäden verstärkt werden. Wenn dieser Prozess systemisch wird, spricht man vom systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Auf der anderen Seite gibt es ein Gegenstück zu SIRS, nämlich das sogenannte compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). Auch ein Überschießen von CARS kann den Verlauf der posttraumatischen Inflammation negativ beeinträchtigen. Sowohl eine Verschiebung in Richtung von SIRS als auch in Richtung von CARS kann zu Organfunktionsstörungen, nosokomialen Infektionen und letztendlich zum Tod führen. Daher ist eine ausgeglichene, frühe posttraumatische Immunantwort für ein gutes Outcome von entscheidender Bedeutung.

Monozyten nehmen eine kritische Stellung sowohl in der primären Immunantwort nach Trauma als auch nach Infektion ein. Durch die Oberflächenexpression von diversen sogenannten pattern-recognition receptors (PRRs), insbesondere Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), können Monozyten Pathogene und sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) erkennen und neutralisieren. Darüber hinaus können Monozyten PAMPs

über major histocompatibility complex class II -Moleküle (MHC-II) dem adaptiven Immunsystem präsentieren und somit als zelluläre Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem fungieren. TLR2, eine Untergruppe der TLRs, ist einer der Hauptrezeptoren für PAMPs von grampositiven Bakterien wie *S. aureus*, dem Hauptkeim für posttraumatische Wundinfektionen und nosokomiale Infektionen.

Es gibt immer noch keinen Konsens über den Einfluss von Trauma auf die Funktion von Monozyten und deren Expressionsprofil von PRRs und MHC-II-Molekülen nach einem Trauma. Verschiedene Studien berichten von einer beeinträchtigten TLR2-Expression bei Monozyten nach Trauma, während sich in anderen Studien eine konstante oder sogar erhöhte TLR2-Expression bei Monozyten nach Trauma gezeigt hat. Die Daten sind auch in Bezug auf die posttraumatische Phagozytoseleistung von Monozyten unbeständig. Während in einigen Studien im frühen posttraumatischen Verlauf im Vergleich zu gesunden Probanden von einer erhöhten Anzahl zirkulierender Monozyten mit erhaltener Phagozytoseleistung berichtet wird, zeigten andere Studien eine verminderte Phagozytoseleistung von Monozyten nach Trauma. Darüber hinaus gibt es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Fähigkeit von Monozyten, proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β oder Tumor necrosis factor (TNF)- α freizusetzen.

Zusammengefasst ist die derzeitige Studienlage widersprüchlich. Zusätzlich wurde es in bisherigen Studien verpasst, die Kombination verschiedener Aspekte wie die Funktionalität der Monozyten in Bezug auf Phänotypisierung oder funktioneller Assays und deren Beobachtung über einen längeren Zeitraum miteinzubeziehen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der bisherigen Studien könnte durch die Natur des Polytraumas bedingt sein, beispielsweise durch verschiedene Verletzungsmuster und Verletzungsschwere, die unterschiedliche Erstversorgung am Unfallort, die Zeit bis zur Ankunft in der Notaufnahme oder die unterschiedliche primäre und definitive Versorgung der Verletzungen. All das kann zu einer unterschiedlichen Antwort des Immunsystems und somit zu unterschiedlichen Outcomes führen.

Daher war es Ziel unserer Studie, die oben genannten Variablen zu eliminieren, und eine kontrollierte Polytraumastudie am Schweinemodell durchzuführen, um die Funktionalität von Schweinemonozyten über einen Zeitraum von 72 Stunden nach Trauma zu untersuchen. Zusätzlich und im Gegensatz zu früheren Studien haben wir die Phänotypisierung von

Monozyten (TLR2 und MHC-II [SLA-DR]) mit einem funktionellen Phagozytose-Assay kombiniert und deren direkte Assoziation in einem unabhängigen Assay analysiert.

Peripheres Blut wurde vor (-1h) und direkt nach der Induktion des Polytraumas (PT) (0h) entnommen, sowie 3,5h, 5,5h, 24h und 72h später. Die Expression von H(S)LA-DR und TLR2 auf Schweine-Monozyten wurde untersucht. Außerdem wurde die Phagozytierungsaktivität von Schweinemonozyten gemessen.

Darüber hinaus wurden aus mechanistischen Gründen Blutproben von 10 gesunden Schweinen zunächst einem TLR2-neutralisierenden Antikörper und anschließend *S. aureus*-Partikeln ausgesetzt, bevor die Phagozytoseleistung der Monozyten untersucht wurde.

Die Anzahl der CD14⁺-Monozyten aller zirkulierenden Leukozyten blieb während des Beobachtungszeitraums konstant, während der Prozentsatz der CD14⁺H(S)LA-DR⁺-Monozyten direkt, 3,5h und 5,5h nach dem Trauma signifikant abnahm. Der Prozentsatz von TLR2⁺ exprimierenden Zellen aus allen Monozyten verringerte sich direkt, 3,5h und 5,5h nach dem Trauma signifikant. Der Prozentsatz der phagozytierenden Monozyten nahm direkt nach Trauma ab und blieb in den ersten 3,5 Stunden nach dem Trauma niedriger, stieg jedoch nach 24 Stunden an. Die Antagonisierung von TLR2 verringerte signifikant die Phagozytoseleistung der Monozyten.

Sowohl der verringerte Prozentsatz der aktivierten als auch der TLR2-exprimierenden Monozyten blieb bestehen, solange die verringerte Phagozytoseleistung beobachtet wurde. Darüber hinaus führte auch die Neutralisation von TLR2 zu einer verminderten Phagozytoseleistung. Daher nehmen wir an, dass eine verringerte TLR2-Expression für die verringerte Phagozytoseleistung verantwortlich ist.

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

AIS: Abbreviated injury scale

APC: Antigen-presenting cells

ARDS: Acute respiratory distress syndrome

ATLS: Advanced trauma life support

ATP: Adenosine triphosphate

BHZP: Bundes Hybrid Zucht Programm

BSA: Bovine serum albumin

CARS: Compensatory anti-inflammatory response syndrome

CD: Cluster of differentiation

CLR: C-type lectin receptors

CVP: Centrale venous pressure

DAMP: Damage-associated molecular pattern

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FCS: Fetal calf serum

HLA: Human leukocyte antigen

HMGB1: High mobility group box-1 protein

HSP: Heat shock proteins

ICU: Intensive care unit

IFN: Interferon

IL: Interleukin

i.m.: intramuskulär

ISS: Injury severity score

i.v.: intravenös

LPS: Lipopolysaccharide

LTA: Lipoteichoic acid

MAP: Mean arterial blood pressure

MHC-II: Major histocompatibility complex class II

mHLA-DR: Monocyte human leukocyte antigen-DR

MOF: Multiple organ failures

mRNA: Messenger ribonucleic acid

NLR: NOD-like receptors

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PBS: Phosphate-buffered saline

PEEP: Positive end-expiratory pressure

PRR: Pattern recognition receptors

RNA: Ribonucleic acid

SEM: Standard error of the mean
SIRS: Systemic inflammatory response syndrome
TGF: Transforming growth factor
TLR: Toll-like-receptor
TNF: Tumor necrosis factor

3. Übergreifende Zusammenfassung

3.1. Einleitung

Trauma ist eine der führenden Todesursachen in Deutschland und weltweit (1, 2). Zusätzlich ist es verbunden mit milliardenschweren Belastungen für das Gesundheitssystem. Die Schwere eines Traumas kann anhand des Injury Severity Scores (ISS) eingeordnet werden, welcher mithilfe der Abbreviated Injury Scale (AIS) berechnet wird (3). Die AIS setzt sich aus 9 Körperregionen zusammen, welche nach Verletzungsschwere beurteilt werden. Die Skala geht von 0 Punkten (unverletzt) bis 6 Punkte (tödlich). Der höchste Wert aus den 3 am schwersten verletzten Regionen wird jeweils quadriert und diese werden anschließend addiert. Dies ergibt den ISS (3, 4). Ein $ISS \geq 16$ wird als moderates Trauma betrachtet, während ein $ISS \geq 25$ als schweres Trauma eingestuft wird (5).

Trauma kann mit verschiedenen Komplikationen einhergehen wie multiples Organversagen (MOF), Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), Dysregulation des Immunsystems, sowie Sepsis (6-8).

Ein Trauma führt immer zu Gewebsverletzung, was wiederum zur Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen, so genannten „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), führt, wie high-mobility group box 1 (HMGB1), DNA und RNA, oder ATP. Diese Moleküle führen zur Aktivierung des Immunsystems, welches die DAMPs neutralisiert, aber auch eine Entzündungsreaktion einleitet (9, 10). Diese Entzündung ist entscheidend, um die Gewebereparatur zu initiieren, kann aber bei Überschießen zu einem so genannten „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) führen, welches o.g. Komplikationen auslösen kann (11). Der Körper verfügt mit dem so genannten „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS) über einen Gegenspieler des SIRS, und beide Systeme befinden sich idealerweise in der Balance. Ein Überwiegen des CARS kann zu einem immunsupprimierten Zustand führen, sodass die Abwehr gegenüber Pathogenen geschwächt ist, was nach Infektion wiederum Komplikationen wie ARDS und Sepsis hervorrufen kann (6).

Eine ausgewogene Immunantwort nach Trauma ist also von immenser Bedeutung für einen möglichst komplikationslosen posttraumatischen Verlauf. Hier spielen Monozyten als Teil des angeborenen Immunsystems eine herausragende Rolle. Sie besitzen sowohl die Fähigkeit

zur Phagozytose als auch zur Antigenpräsentation an das erworbene Immunsystem, womit sie eine gezielte Immunabwehr einleiten können. Dazu sind Monozyten mit diversen Rezeptoren ausgestattet, so genannte „pattern recognition receptors“ (PRRs), mit denen sie DAMPs, aber auch pathogen-assoziierte Moleküle, so genannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) detektieren und neutralisieren können (12).

Zu diesen PRRs gehören vornehmlich Toll-like Rezeptoren (TLRs), aber auch C-type lectin receptors (CLRs), oder zytoplasmatische Rezeptoren wie nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) (13). Es sind 10 humane TLRs bekannt (TLR1-11)(14, 15), die sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma in Endosomen exprimiert werden. Jeder der 10 TLRs besitzt zudem unterschiedliche Affinitäten für unterschiedliche PAMPs und DAMPs. So bindet TLR1 Triacyl-Lipopeptide, TLR3 virale Nukleinsäuren, oder TLR5 Flagellin. Zu den besser untersuchten Rezeptoren gehört der TLR2, der auf der Zelloberfläche exprimiert wird und als Dimer mit TLR1 oder TLR6 bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide wie Lipoteichonsäure (LTA) bindet (16). LTA ist ein Bestandteil der Zellwand gram-positiver Bakterien wie *S. aureus*, welches der häufigste Erreger der posttraumatischen Wundinfektion, nosokomialen Infektionen und Sepsis ist (17, 18).

Das Binden von Liganden an TLRs führt über eine Signalkaskade neben einer Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 β und Tumor necrosis factor (TNF)- α (19-21) zu einer so genannten „inside-out activation“, welches die Affinität von Phagozytose-induzierenden Rezeptoren erhöht und somit einleitet (16). Phagozytierte Pathogene werden in Endosomen desintegriert und ihre Bestandteile anschließend auf major histocompatibility complex class II (MHC-II) Moleküle geladen. Diese dienen der Antigen-Präsentation (22).

MHC-II Moleküle werden durch humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Gene (HLA-DQ, HLA-DR) codiert und von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Die nach Phagozytose im Endosom freigesetzten pathogenen Proteinfragmente werden auf MHC-II Moleküle geladen, welche anschließend mithilfe des mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) kommunizieren, diese aktivieren und somit die spezifische Immunantwort via T-Helfer-Zellen (Cluster of differentiation [CD] 4⁺) einleiten (22, 23).

Die Auswirkungen eines Traumas auf die Funktion der Monozyten sind noch unklar und teilweise widersprüchlich in der Literatur beschrieben. Seshadri et al. (2017) fanden bei Traumapatienten in den ersten fünf Tagen nach Trauma signifikant erhöhte Spiegel zirkulierender Monozyten im Vergleich zu gesunden Probanden (24). Jedoch zeigte sich eine

signifikante Depression der monozytären Zytokinproduktion (TNF- α , IL-1 β), sowie eine signifikant beeinträchtigte Expression von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche. Die Phagozytosefähigkeit jedoch blieb über 5 Tage nach Trauma unbeeinträchtigt (24). Heftrig et al. (2017) berichteten im Gegensatz dazu von einem initial erniedrigten Spiegel zirkulierender Monozyten bei konstanter Verringerung der MHC-II-Expression, sowie eine beeinträchtigte Produktion von IL-1 β über den Zeitverlauf von zehn Tagen nach Trauma im Vergleich zu gesunden Probanden (25).

Andere Studien zeigen eine beeinträchtigte Phagozytosefähigkeit von Monozyten im posttraumatischen Verlauf (26, 27). Die Datenlage ist in Bezug auf die TLR2-Expression auf Monozyten nach Trauma ebenfalls uneinheitlich. Perez-Barcena et al. (2010) haben eine erhöhte TLR2-Expression auf Monozyten bei Traumapatienten im Vergleich zu gesunden Probanden über einen Zeitraum von 14 Tagen festgestellt (26). Es fand sich eine signifikant verringerte Expression von TLR2 bei Patienten, die eine Infektion entwickelten, im Vergleich zu Patienten ohne Infektionen (26). Traumapatienten haben zudem eine beeinträchtigte Phagozytoseaktivität von Monozyten während der 14 Tage bei im Vergleich zu gesunden Probanden aufgewiesen (26). Im Gegensatz zu diesen Befunden berichteten Adib-Conquy et al. (2003) von einer konstanten TLR2-Expression auf Monozyten bei Traumapatienten bei der Aufnahme im Vergleich zu gesunden Probanden (28). Andere Studien wiesen eine beeinträchtigte Expression von TLR2 bei Traumapatienten während der ersten 48 Stunden oder über einen Zeitverlauf von 10 Tagen nach Trauma nach im Vergleich zu gesunden Probanden (25, 29).

Die Expression der antigenpräsentierenden HLA-Moleküle, der Zelloberflächenproteine MHC-II, ist seit langem bekannt und auf humanen Monozyten gesunder Probanden gut beschrieben (30, 31). Jedoch wurde früh nach einem hämorrhagischen Schock oder einer schweren abdominalen Operation eine beeinträchtigte MHC-II-Expression auf Makrophagen und speziell auf Monozyten berichtet (32, 33). In Bezug auf Trauma wurde über eine verminderte MHC-II-Expression in menschlichen Monozyten nach Trauma berichtet (25, 34). Dennoch ist das Expressionsprofil der H(S)LA, der porcinen MHC-Moleküle, noch immer nicht vollständig erforscht, und noch weniger ist über ihr Verhalten nach Trauma bekannt. MHC-I- und MHC-II-Moleküle wurden erstmals von Chamorro et al. auf Monozyten von Schweinen beobachtet (35). Raymond et al. (2005) beschrieben ebenfalls die Expression von MHC-II auf Monozyten von Schweinen und zeigten einen Anstieg nach Zugabe von sowohl Lipopolysaccharid (LPS) als auch von Lipoteichonsäure (LTA) (36).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es Veränderungen in der TLR2- und MHC-II-Expression sowie Modulationen im phagozytierenden Verhalten von Monozyten nach schwerem Trauma gibt, jedoch die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen früherer Studien enorm ist. Noch immer sind die Mechanismen nicht entdeckt, und noch weniger ist im Hinblick auf das experimentelle Polytraumamodell im Großtier bekannt. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den oben genannten Studien könnten auf die unkontrollierbare Art des Traumas und seiner Komplikationen zurückzuführen sein. In mehreren Studien wurde nur ein Zeitpunkt im klinischen Verlauf (z.B. Aufnahme oder in den ersten 48 Stunden nach Aufnahme) berücksichtigt. Außerdem gibt es nur sehr wenige Studien, die die Phänotypisierung von Immunzellen mit ihrer physiologischen Funktion nach einem Trauma kombinieren.

Daher wurde diese Studie zweigeteilt. Zum einen wurde die Expression von MHC-II (SLA-DR) und TLR2 auf zirkulierenden Monozyten in einem Zeitverlauf von 72 Stunden nach schwerem Trauma in einem kontrollierten Schweinelangzeit-Polytraumamodell gemessen. Parallel dazu wurde die phagozytierende Kapazität der Monozyten als eine ihrer physiologischen Funktionen bewertet. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Monozytenfunktion posttraumatisch verändert ist und die porcinen Ergebnisse Teile der bereits vorhandenen Studien an Traumapatienten bestätigen kann, um so dazu beizutragen, aktuell bestehende Diskrepanzen zu beseitigen.

In einem zweiten Teil wurde die direkte Assoziation von TLR2 mit der Phagozytoseleistung anhand gesunder Schweine analysiert, um die Hypothese zu untersuchen, ob eine Blockierung von TLR2 zu einer Abnahme der Phagozytoseleistung führt.

Insgesamt wurden zwei Ziele verfolgt: erstens die Etablierung des Schweine-Polytraumamodells als Möglichkeit zur weiteren Untersuchung der posttraumatischen physiologischen Immunantwort von Patienten und zweitens die Verknüpfung unserer einzelnen Studienteile, um mehr Wissen über die posttraumatischen Immun(dys-)regulierung und deren zugrundeliegenden Mechanismen zu erhalten.

3.2. Darstellung der Publikation

3.2.1. Methodik

Ethik

Die Versuche wurden von dem zuständigen Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV-NRW: AZ TV-Nr.: 84–02.04.2014.A265) genehmigt und unter Beachtung des deutschen Bundesgesetzes in Bezug auf den Tierschutz, die institutionellen Richtlinien und die Kriterien im „Leitfaden für die Pflege und Verwendung von Labortieren“ (Achte Ausgabe The National Academies Press, 2011) durchgeführt. In unserer Studie wurden die Tiere konsequent gemäß den ARRIVE-Richtlinien behandelt. Die Tierversuche wurden am Institut für Versuchstierkunde und Experimentelle Chirurgie der RWTH Aachen durchgeführt.

Versuchstiere

Für das Schweinelangzeit-Polytraumamodell wurden zwölf männliche Tiere der deutschen Landrasse (*Sus scrofa*; 3 Monate alt, 30 ± 5 kg) aus einer krankheitsfreien Zuchtanlage in die Studie einbezogen. In klimatisierten Räumen wurden alle Tiere von einem Tierarzt untersucht und vor den Experimenten mindestens 7 Tage lang an ihre Umgebung gewöhnt. In der Nacht vor den Experimenten wurden die Schweine gefastet, hatten aber freien Zugang zu Wasser.

Diese Studie präsentiert Teilergebnisse, die aus einem Großtiermodell mit Schweinen mit multiplen Traumata erhalten wurden. Das Modell wurde bereits von Eschbach et al. ausführlich beschrieben (37).

Für die mechanistischen Untersuchungen wurden zehn männlichen Pietrain-Schweine (*Sus scrofa*, 6 Monate alt, 100 ± 5 kg) aus einer krankheitsfreien Zuchtanlage des Bundes Hybrid Zucht Programm (BHZP) einbezogen.

Anästhesie und OP-Vorbereitung

Die Versuchstiere wurden mit einer intramuskulären (i.m.) Gabe von Azaperon (Stresni TM, Janssen, Deutschland) in einer Dosis von 4 mg/kg prämediziert. Die Anästhesie wurde intravenös (i.v.) eingeleitet mit Propofol (3 mg/kg), gefolgt von einer orotrachealen Intubation (7,5-Kanal-Röhrchen, Hi-Lo LanzTM). Während des Untersuchungszeitraums über 72 Stunden wurde die Anästhesie und Analgesie kontinuierlich durch die i.v. Gabe von Propofol und Sufentanil aufrechterhalten, um peri- und postoperative Schmerzen oder Bewusstseinsverlust zu verhindern. Die Tiere waren zu keinem Zeitpunkt nach der Induktion des Polytraumas bei Bewusstsein. Die Tiere wurden im volumengeregelten Modus (Draeger, Evita, Lübeck, Deutschland) mit Raumluft bei einer Tidalvolumeneinstellung von 6 ± 8 ml/kg, positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 8 mmHg (Plateaudruck < 28 mmHg), und $p\text{CO}_2$ von 35 ± 45 mmHg beatmet, wie zuvor beschrieben. Sämtliche Katheter wurden aseptisch an verschiedenen Lokationen eingeführt: Vena jugularis externa zur Verabreichung von Flüssigkeiten, Anästhetika und kontinuierlichen Überwachung des zentralvenösen Drucks (CVP, Zentralvenenkatheter 4 Lumen Katheter, 8,5 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Deutschland), Vena femoralis zur Induktion von Hämorrhagien (3-Lumen-Hämodialyse, 12,0 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Deutschland) und Arteria femoralis zur kontinuierlichen Blutdruckmessung (4,0 Fr. arterieller Linienkatheter, Vygon, Deutschland). Ein Blasenkateter wurde ebenfalls in die Blase eingeführt (12,0 Fr, Cystofix, Braun, Melsungen, Deutschland). Kristalloide Flüssigkeit (Sterofundin ISO1) diente zum kontinuierlichen Flüssigkeitsmanagement (2 ml kg/BW/h). Die Baseline-Messungen wurden erfasst nach Instrumentierung und Kalibrierung vor Beginn des Experiments.

Induktion des Polytraumas

Das Polytrauma wurde wie zuvor beschrieben induziert (37). Zusammengefasst wurde die Antibiotikaprophylaxe (Ceftriaxon® 2 g) vor der Operation und alle 24 Stunden bis zur Euthanasie verabreicht. Vor der Induktion des Traumas wurde der Anteil an eingeatmetem O_2 (FiO_2) auf 0,21 eingestellt und die Flüssigkeitsverabreichung auf 10 ml/h reduziert. Die Versuchstiere wurden auf der rechten Seite positioniert und es wurde mit einem Bolzenschussgerät mit einem einmaligen Bolzenschuss eine Femurfraktur am rechten Hinterbein induziert (Blitz-Kerner, Turbocut JOBB GmbH, Deutschland, 9×17 , Dynamit Nobel AG, Troisdorf, Deutschland). Nach dem Zurücksetzen in die dorsale Position wurde

ein stumpfes Thoraxtrauma mit einem Bolzenschuss auf den rechten unteren Brustkorb induziert. Schließlich wurden eine Mittellinien-Laparotomie und eine unkontrollierte Blutung für 30 Sekunden nach kreuzweiser Inzision des kaudalen Leberlappens ($4,5 \times 4,5$ cm) induziert. Mit sterilen Mullkompressen wurde die Leber abgedeckt. Ein druckgesteuerter hämorrhagischer Schock unter Ausbluten aus der rechten Oberschenkelarterie wurde durchgeführt, bis ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von 40 ± 5 mmHg erreicht war. Dieser wurde für 90 Minuten aufrechterhalten.

Während der hämorrhagischen Schockperiode durften die Tiere in einen hypothermischen Zustand absinken. Dies imitierte das präklinische Szenario.

Die Versorgung des Polytraumas begann unmittelbar nach dem hämorrhagischen Schock durch das Anpassen des FiO_2 an die Ausgangswerte und das Reinfundieren des zuvor entnommenen Bluts und zusätzlicher Flüssigkeit (Sterofundin ISO®; 2 ml kg/BW/h). Das Aufwärmen wurde mit einem Warmluftsystem durchgeführt, bis Normothermie erreicht war ($38,7\text{--}39,8$ °C).

Im Anschluss an die Traumainduktion wurde die klinische Behandlung der offenen Femurfraktur gemäß den festgelegten Traumarichtlinien mittels Fixateur externa durchgeführt. Das Intensiv- und Komplikationsmanagement folgte den standardisierten klinischen Protokollen gemäß den neuesten Empfehlungen des European Resuscitation Council und Advanced Trauma Life Support (ATLS) (38, 39). Nach dem Beobachtungszeitraum wurden die Tiere mit Kaliumchlorid bis zum Herzstillstand eingeschläfert.

Blutentnahmen

Unmittelbar vor der Traumainduktion wurden als Kontrolle Blutproben in Monovetten mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) entnommen, außerdem direkt nach der Operation, dazu 3.5 h, 5.5 h, 24 h und 72 h nach Trauma. Die Proben wurden bis zur anschließenden Analyse bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ex-vivo-In-vitro-Vollblutstimulation für Phagozytose-Assay

Blutproben (40 µl) wurden in Polystyrol-FACS-Röhrchen (BD Pharmingen TM) überführt und mit 40 µl RodoRot (pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate for Phagocytosis, ThermoFisher, Germany) 1 h bei 37°C inkubiert. 5% CO₂ gemäß Herstellerangaben. Eine Negativkontrolle ohne *S. aureus* Red BioParticles Conjugate wurde eingeschlossen. Danach wurde 1 ml FACS-Lyselösung (FACS Lysing Solution, 1:10, BD PharmingenTM, Heidelberg, Deutschland) zugegeben, gefolgt von einem weiteren Inkubationsschritt (10 Minuten) für die Lyse der Erythrozyten. Danach wurden 2 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) zugegeben und die Proben 8 Minuten lang bei Raumtemperatur bei 800 G zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 3 ml PBS mit Zusätzen (0,5% Rinderserumalbumin (BSA), FACS-Puffer) gewaschen und erneut 8 Minuten bei 800 G zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung wurde durch Durchflusszytometrie unter Verwendung der BD FACS CantoTM- und FACS DIVATM-Software (FACSCanto II, BD Biosciences) durchgeführt. Die Monozytenpopulation wurde durch Vorwärts- und Seitenstreuung unterschieden. In jeder Probe wurden 300.000 Monozyten gemessen. Die Phagozytoseaktivität der Monozyten wurde als Prozentsatz der Zellpopulation quantifiziert.

Ex-vivo-in-vitro-Analyse der Oberflächenrezeptoren

Blutproben (100 µl) wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit Maus-Anti-Human-CD14-PE (Klon TÜK4, BD Bioscience), Maus-Anti-Human-HLA-DR PerCP-Cy5.5 (Klon HL-38, Novus Biologicals) und polyklonalem Kaninchen-Anti-Human-TLR2 Alexa Fluor 700 (Bioss Antibodies, 5 µl) inkubiert. Kontrollproben wurden mit vorgeschlagenen Isotypkontrollen für die Einstellungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 ml FACS-Lyselösung (BD PharmingenTM) zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 800 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden durch Durchflusszytometrie mit BD FACS CantoTM unter Verwendung der FACS DIVATM-Software (BD Biosciences) gemessen. Die Monozyten wurden durch Gating von CD14⁺-Zellen unterschieden. Mindestens 300.000 Monozyten wurden von jeder Probe gemessen. Nicht stimulierte Proben wurden als Kontrolle gemessen.

TLR2-Neutralisation gefolgt von Phagozytose-Assay ohne vorheriges Trauma

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden Blutproben (EDTA-Röhrchen, Sarstedt) von zehn männlichen Pietrain-Schweinen (*Sus scrofa*, 6 Monate alt, 100 ± 5 kg) aus einer krankheitsfreien Zuchtanlage des Bundes Hybrid Zucht Programm (BHZP) für mechanistische Untersuchungen entnommen. 50 μ l Vollblut wurden in Polystyrol-FACS-Röhrchen (BD PharmingenTM) gegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit einem Anti-Human-TLR2 (polyklonaler Ratten-IgG, Invivogen, 20 μ g/ml) inkubiert. Kontrollproben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit dem normalen Ratten-IgG-Kontroll-PAb-Antikörper (Invivogen, 20 μ g/ml) oder ohne Antikörper (ctrl) inkubiert. Im Folgenden wurden 40 μ l jeder Probe mit pH-Rodo-Rot-Biopartikeln (pHrodo[®] Rot *S. aureus* BioParticles[®] Conjugate for Phagocytosis, ThermoFisher, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers inkubiert, um die Phagozytoseleistung von Monozyten zu bestimmen (siehe Protokoll oben). Die Monozytenpopulation wurde durch Vorwärts- und Seitenstreuung unterschieden. In jeder Probe wurden 300.000 Monozyten gemessen. Die Phagozytosesaktivität von Monozyten wurde als Prozentsatz der Zellpopulation quantifiziert.

Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) durchgeführt. D'Agostino-Pearson-Normalitätstest wurde angewendet, um die Normalverteilung der Daten zu bestimmen. Um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu vergleichen, wurde die statistische Matched-Pair-Analyse unter Verwendung von ANOVA-Wiederholungsmessungen (Friedman-Test) mit einem Dunn-Post-hoc-Test durchgeführt. Ein p-Wert von weniger als 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

3.2.2. Ergebnisse

Verhältnis von CD14⁺ Monozyten zu Leukozyten

Die Gatingstrategie ist in Fig. 1 gezeigt. Der Anteil der peripheren CD14⁺-Monozyten an den gesamten Leukozyten betrug $5,7 \pm 0,3\%$ vor Trauma (Fig. 2A). Es gab keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert über den posttraumatischen Verlauf von 72

Stunden (direkt nach der Operation: $5,3 \pm 0,3\%$, 3,5 Stunden: $6,3 \pm 0,2\%$, 5,5 Stunden: $6 \pm 0,2\%$, 24 Stunden: $5,1 \pm 0,3\%$ und 72 h: $5,9 \pm 0,3\%$, Fig. 2A).

Oberflächenexpression von HLA-DR auf CD14⁺-Monozyten

Der Anteil der peripheren CD14⁺-Monozyten, die HLA-DR exprimierten, betrug anfangs $11,6 \pm 2,2\%$ an den gesamten Leukozyten (Fig. 2B). Das Verhältnis war direkt nach der Operation im Vergleich zum Ausgangswert signifikant verringert ($6,5 \pm 1,3\%$ gegenüber $11,6 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$, 2B). Das Verhältnis war zudem 3,5 h ($5,5 \pm 0,9\%$) und 5,5 h ($6,3 \pm 1,2\%$) nach Trauma signifikant verringert, verglichen mit dem Ausgangswert von $11,6 \pm 2,2\%$ ($p < 0,05$, 2B). 24 h und 72 h nach Trauma erreichte die Population Werte, die verglichen mit dem Ausgangswert leicht erhöht, jedoch nicht signifikant erhöht waren ($17,3 \pm 3,5\%$ bzw. $15,2 \pm 4\%$, Fig. 2B).

Oberflächenexpression von TLR2 auf CD14⁺ Monozyten

Vor Trauma exprimierten $45,5 \pm 1,8\%$ der CD14⁺-Monozyten TLR2 auf ihrer Zelloberfläche (3A). Unmittelbar nach Operation fielen die TLR2 exprimierenden CD14⁺-Monozyten im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ab ($39,3 \pm 1\%$ gegenüber $45,5 \pm 1,8\%$, $p < 0,05$, Fig. 3A). CD14⁺-Monozyten, die TLR2 exprimierten, blieben außerdem 3,5 h ($39,9 \pm 1,3\%$) und 5,5 h ($40 \pm 1,3\%$) nach Trauma im Vergleich zu Werten vor der Operation signifikant erniedrigt ($p < 0,05$, Fig. 3A). 24 h und 72 h nach Trauma erreichte der Anteil an CD14⁺-Monozyten, die TLR2 exprimierten, Werte, die mit dem Kontrollwert vergleichbar waren ($42,5 \pm 1,5\%$ bzw. $43 \pm 1,8\%$, 3A).

Phagozytose-Aktivität von Monozyten nach Trauma

$8,9 \pm 0,6\%$ der Monozyten waren vor dem Trauma phagozytotisch aktiv (Fig. 3B). Nach der Operation war die Phagozytose-Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert signifikant verringert ($5,7 \pm 0,6\%$ gegenüber $8,9 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$, Fig. 3B). Die Phagozytose-Aktivität der Monozyten blieb 3,5 h ($6,4 \pm 0,7\%$) und 5,5 h ($6,5 \pm 0,8\%$) nach Trauma im Vergleich zu Daten vor dem Trauma ($8,89 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$, Fig. 3B) signifikant verringert. Die Fähigkeit

zur Phagozytose der Monozyten erholte sich 24 h und 72 h nach Trauma und erreichte Werte, die mit denen der Kontrollen vergleichbar oder höher waren ($10,6 \pm 2\%$ bzw. $13,1 \pm 2,8\%$ gegenüber $8,9 \pm 0,6\%$) (Fig. 3B).

Phagozytose-Aktivität von Monozyten nach TLR2-Neutralisation ohne vorheriges Trauma

Dieser Versuch fand an gesunden Schweinen ohne Polytrauma statt.

$4,4 \pm 0,8\%$ der Monozyten phagozytierten *S. aureus*-Biopartikel (ctrl, Fig. 4) ohne vorherige TLR2-Neutralisation. Nach der TLR2-Neutralisation (nAB TLR2) nahm die Phagozytose-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Antikörper signifikant ab ($2,9 \pm 0,2\%$ gegenüber $4,4 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$, Fig. 4). Die mit Kontrollantikörper (nAB ctrl) inkubierten Monozyten zeigten eine ähnliche Phagozytose-Aktivität wie die ctrl-Gruppe ($4,2 \pm 0,6\%$ gegenüber $4,4 \pm 0,8\%$, 4).

3.2.3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum einen die Vergleichbarkeit des posttraumatischen Verhaltens von porcinen und humanen Monozyten untersucht. Hierzu wurde die Expression von MHC-II (SLA-DR) und TLR2 auf zirkulierenden porcinen Monozyten in einem Zeitverlauf von 72 Stunden nach schwerem Trauma in einem kontrollierten Schweinelangzeit-Polytraumamodell gemessen. Parallel dazu wurde die phagozytierende Kapazität der porcinen Monozyten als eine ihrer physiologischen Funktionen bewertet. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Monozytenfunktion posttraumatisch verändert ist, die porcinen Ergebnisse sich mit Ergebnissen aus früheren Studien am Menschen decken und somit das Polytraumamodell valide für die Übertragung auf den Menschen sei. Unsere Ergebnisse zeigen, dass unsere Hypothese sich teils als richtig herausstellte. Unsere Ergebnisse decken sich mit der bestehenden Literatur, aufgrund der beschriebenen Diskrepanz innerhalb der Literatur allerdings nicht vollständig. So konnten wir verschiedene Ergebnisse bestätigen, während andere widerlegt wurden.

Dies wird im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert:

Fairbairn et al. (2013) konnten zeigen, dass porcine Monozyten CD14 exprimieren (12). Obwohl Fairbairn et al. einen anderen Klon des monoklonalen Maus-Antikörpers gegen CD14 vom Schwein verwendeten (Klon: MIL2), haben wir bestätigt (Klon: TÜK4), dass das Schweinmodell für die Untersuchung der in-vivo-Funktion von CD14 und Monozyten geeignet ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass sich der Blutspiegel der zirkulierenden CD14-positiven Monozyten über einen Zeitraum von 72 Stunden nach einem Trauma im Schweinmodell nicht signifikant verändert.

Im Allgemeinen ist wenig über die Expression von H(S)LA, den MHC-Molekülen des Schweins, auf Monozyten bekannt. Chamorro et al. (2004) entdeckten SLA-I-, SLA-II-DQ- und SLA-II-DR-Moleküle auf Schweinmonozyten (35), und Raymond et al. (2005) beobachteten mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Expression von MHC-II auf Schweinmonozyten und deren Anstieg nach Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Lipoteichonsäure (LTA) (36). Weitere Analysen haben gezeigt, dass SLA-1*0401 vom Schwein und HLA-A*0101, ein humanes Leukozytenantigen (HLA) der Klasse I, dieselben Peptide präsentieren können, allerdings in unterschiedlichen Konformationen, was eine spezieübergreifende Epitopräsentation belegt (41), was insofern von Bedeutung ist, als bereits nachgewiesen wurde, dass humanes Anti-HLA-DR Leukozytenantigene vom Schwein

erkennt. Im Hinblick auf die Relevanz der Expression konnten Monneret et al. (2006) die anhaltend geringere Expression von MHC-II-Molekülen auf menschlichen Monozyten bei Patienten mit Infektionen, die eine erhöhte Sterblichkeitsrate aufwiesen, korrelieren, während Überlebende eine steigende MHC-II-Expression aufwiesen (42). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Expression von MHC-II ein hochwirksamer Marker für das Outcome nach Infektion sein könnte (42). In Bezug auf Traumata wurde über eine signifikant verringerte Expression von MHC-II-Molekülen auf menschlichen Monozyten berichtet, allerdings korrelierte dieses Phänomen nicht mit Infektionen nach Verletzungen (25, 34). In Übereinstimmung mit diesen Studien wurde in unserer Studie zum ersten Mal die posttraumatische Reifung von Schweinemonozyten untersucht. Wir konnten eine verminderte MHC-II-Expression auf Schweinemonozyten im frühen posttraumatischen Verlauf mit einer Erholungsphase nach 24 Stunden nachweisen. Aufgrund des eingeschränkten Versuchsdesigns hinsichtlich der Dauer des Beobachtungszeitraums haben wir den klinischen Verlauf nicht ausgewertet und können daher keine Aussage über den Einfluss der beobachteten Abnahme der H(S)LA-DR-positiven Monozyten auf die möglicherweise auftretenden Komplikationen in unserem Modell machen. Nichtsdestotrotz bestätigen unsere Ergebnisse die Daten von Traumapatienten und deuten auf eine geringere Reifung der Monozyten mit anschließender Funktionsbeeinträchtigung nach einem Trauma hin. Die Relevanz dieser Ergebnisse muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die Aktivierung von Monozyten wird über TLRs ausgelöst. In Anbetracht der funktionellen Veränderungen von Monozyten nach einem Trauma erscheint es daher sinnvoll, trotz ihrer oben beschriebenen Reifung die TLR-Expression auf Monozyten nach einem Trauma zu analysieren. Die Gene von 10 Schweine-TLRs (TLR1-10) sind beschrieben und in der öffentlichen Nukleotiddatenbank aufgeführt. Bisher ist jedoch nur wenig über ihre Expression auf Monozyten von Schweinen bekannt und noch weniger im Hinblick auf ein schweres Trauma bei Schweinen. Liu et al. (2009) wiesen die Genexpression für TLR2, 3, 4, 7, 8 und 9 nach und zeigten eine signifikante Hochregulierung ex-vivo-in-vitro für TLR2, 4 und 8 nach einer Infektion in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Schweinen (43). Interessanterweise wurde bei chirurgischen Traumapatienten eine erhöhte TLR2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (44). Lendemans et al. (2007) haben jedoch gezeigt, dass die Expression des TLR2-Rezeptors auf Monozyten innerhalb der ersten 48 Stunden nach einem schweren Trauma bei Patienten signifikant abnimmt (29), was mit den hier berichteten Daten übereinstimmt und die frühe Abnahme der TLR2 exprimierenden

Monozyten unmittelbar nach dem Trauma bestätigt. Dies deutet darauf hin, dass das Schweinetraumamodell die Veränderungen bei den TLR2 exprimierenden Monozyten darstellt, die bei Traumapatienten beobachtet wurden.

Die Erkenntnisse über das posttraumatische Verhalten von Schweinemonozyten sind gering, und auch ihre phagozytische Aktivität nach einem Trauma wurde in dieser Studie zum ersten Mal in einem Schweinetraumamodell untersucht. Die Expression von TLR2 auf CD14+ Monozyten war gleichzeitig mit der phagozytischen Aktivität vermindert, insbesondere direkt nach der Operation, sowie 3,5 und 5,5 Stunden nach dem Trauma. Diese Befunde führten uns zu der Hypothese, dass die verminderte TLR2-Expression auf Monozyten mit ihrer verminderten phagozytischen Aktivität von *S. aureus*-Partikeln im frühen posttraumatischen Verlauf zusammenhängt.

Im zweiten Teil dieser Studie wurde somit der direkte Zusammenhang der TLR2-Expression und Phagozytosefähigkeit anhand gesunder Schweine untersucht. Wir vermuteten, dass eine Blockierung von TLR2 die Phagozytosefähigkeit von Monozyten signifikant einschränkt.

Frühere Veröffentlichungen wiesen bereits auf die Abhängigkeit der Phagozytose von PRRs hin und unterstützten unsere Hypothese Quelle dafür. Versuche, die TLR2-Expression mit der verminderten Immunaktivität auf Monozyten, wie der Phagozytose nach schwerem Trauma, zu korrelieren, sind begrenzt. Sturm et al. (2017) haben eine verringerte Phagozytoseaktivität menschlicher Monozyten in den ersten beiden Tagen nach einem schweren Trauma gezeigt, mit einer Erholung ab dem dritten Tag nach der Verletzung (27). Die Daten aus dieser Studie bestätigen die frühe verringerte Phagozytose, die auch bei den Schweinen nach Trauma beobachtet wurde. Allerdings erholen sich die Monozyten von Schweinen im Vergleich zu menschlichen Proben nach einem Trauma offenbar schneller.

Freeman und Grinstein (2014) haben sich mit dem Zusammenhang zwischen TLRs und der phagozytischen Aktivität befasst (45): Kurz gesagt führt die TLR-Aktivierung zu einer sogenannten Inside-Out-Aktivierung, die die Mobilität der phagozytischen Rezeptoren an der Zelloberfläche/Zellmembran erhöht und dadurch die Aufnahme von Partikeln/Pathogenen erleichtert (45). In einem anderen in-vitro-Modell wurde gezeigt, dass die spezifische Phagozytose wahrscheinlich mit der Erkennung von Zellwandkomponenten einhergeht, was die Beteiligung eines TLR2-abhängigen Weges erfordert (46, 47). Humane periphere Blutmonozyten, die mit einem TLR2-Agonisten behandelt wurden, zeigten in vitro eine deutlich verbesserte Phagozytosefähigkeit (48). Folgerichtig haben auch unsere Ergebnisse

gezeigt, dass eine frühzeitige verminderte TLR2-Expression in Schweinemonozyten mit einer gleichzeitig verminderten Phagozytoseaktivität nach einem Trauma verbunden war. Um die Rolle von TLR2 bei der Phagozytose-Reaktion von Monozyten gegen *S. aureus* zu definieren, untersuchten wir die Phagozytosefähigkeit von TLR2-neutralisierten Monozyten, die von gesunden Schweinen stammten. Wir konnten unsere Hypothese bestätigen. Die Neutralisierung von TLR2 reduzierte die Phagozytoserate der porcinen Monozyten signifikant.

Zusammengenommen deuten unsere Daten darauf hin, dass die Abnahme des Anteils TLR2-positiver Monozyten nach einem Trauma für die Abnahme der Phagozytose von Monozyten verantwortlich sein könnte, die wir in der vorliegenden Studie beobachtet haben. In Verbindung mit den Ergebnissen früherer Veröffentlichungen gehen wir davon aus, dass TLR2 wahrscheinlich die Phagozytosefähigkeit von Monozyten für bestimmte bakterielle Partikel im Polytraumamodell des Schweins vermittelt.

Trotz neuer Einblicke in die Zellphysiologie des Schweins weist unsere Studie mehrere Einschränkungen auf. Erstens ist die sehr geringe Phagozytosekapazität der Zellen möglicherweise auf die Verwendung von EDTA- und nicht Heparin-Blut für den Test zurückzuführen. Außerdem muss noch geklärt werden, ob die frühe Phagozytose-Depression der Monozyten das Ergebnis nach einem Trauma beeinflusst. Aufgrund des begrenzten Beobachtungszeitraums (72 Stunden) können unsere Ergebnisse nicht mit bestimmten Ergebnissen wie Infektionen, Sepsis, Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation oder Beatmungsbedarf in Verbindung gebracht werden, die weit nach 72 Stunden auftreten. Mehrere Studien deuten auf intrazelluläre Prozesse als Ursache für eine beeinträchtigte posttraumatische Funktion der Monozyten hin. Es gibt verschiedene Mechanismen der TLR-Regulierung, auf die hier nicht eingegangen wurde, wie z. B. die Lokalisierung und das Trafficking zwischen Golgi und Zelloberfläche, Interaktionen der Transmembrandomäne oder TLR-Adaptermoleküle als entscheidende Ziele des Traumas, die eine Veränderung der TLR-Expression und -Funktion bewirken (49, 50). Das Gleiche gilt für die phagozytische Aktivität von Monozyten. Seshadri et al. beobachteten eine gleichbleibende phagozytische Aktivität von *S. aureus* trotz einer beeinträchtigten TLR2- und MHC-II-Expression (24). Die Autoren schlossen daraus, dass die verminderte TLR2-Expression durch andere Moleküle kompensiert werden könne, die an der Regulierung der Phagozytose beteiligt sind. Eine

weitere Einschränkung unserer Studie ist die Verwendung unterschiedlicher Unterarten von Schweinen (Deutsche Landrasse vs. Pietrain) in verschiedenen Teilen der Studie. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Unterarten mussten sich die "Polytrauma-Schweine" vor dem Trauma bestimmten Prozeduren unterziehen (Anästhesie und mehrere Katheter, wie beschrieben), was zu einem Priming der Immunzellen geführt haben könnte, was zu einer erhöhten phagozytischen Aktivität vor dem Trauma im Vergleich zu den "gesunden" Schweinen führte. In künftigen Studien sollten verschiedene Teile mit Proben der gleichen Unterart durchgeführt werden, die die gleichen Behandlungen erhalten. Die Ergebnisse in beiden Teilen unserer Studie bauen jedoch aufeinander auf, und die Ergebnisse und Trends sind plausibel. Außerdem wurden andere Monozytenpopulationen (schwach CD14-positive, CD16-positive Zellen usw.) nicht in die Analysen einbezogen (51-53).

Unsere Studie muss als ein erster Ansatz zur Erforschung solcher Phänomene angesehen werden, wenn die posttraumatische Zellphysiologie von Schweinen mit der des Menschen vergleichbar ist. Wir haben mit Experimenten an Monozyten begonnen und unsere Ergebnisse sind vielversprechend. Es müssen jedoch weitere Studien für verschiedene Zelllinien durchgeführt werden, auch für die anderen erwähnten Populationen von Monozyten, um wirklich ein Polytraumamodell für Schweine zu etablieren.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass porcine Monozyten nach einem Polytrauma eine verminderte TLR2-Expression und eine gestörte Reifung sowie eine reduzierte bakterielle Clearance durch Phagozytose im frühen posttraumatischen Verlauf aufweisen. Die gestörte Phagozytosekapazität steht in engem Zusammenhang mit der verminderten TLR2-Expression auf Monozyten und könnte ein neues therapeutisches Ziel zur Verbesserung der Phagozytose während einer Infektion darstellen. Außerdem ist dieses Schweinemodell repräsentativ für die anfänglich unterdrückte Funktion der Monozyten nach einem Trauma beim Menschen.

3.2.4. Schlussfolgerungen

- Das Verhältnis von Schweinemonozyten zu allen Leukozyten ändert sich im Verlauf der posttraumatischen Phase nicht wesentlich.

- Schweinemonozyten reifen in der frühen posttraumatischen Phase nicht aus.
- Schweinemonozyten weisen im frühen posttraumatischen Verlauf eine verminderte Expression von TLR2 auf.
- Schweinemonozyten weisen im frühen posttraumatischen Verlauf eine beeinträchtigte phagozytäre Aktivität auf.
- Die beeinträchtigte Phagozytosefunktion der Monozyten steht in engem Zusammenhang mit ihrer verminderten TLR2-Expression.

4. Publikation

Übersicht der zur Veröffentlichung angenommenen Publikationen

- 4.1.1. Computational Derivation of Core, Dynamic Human Blunt Trauma Inflammatory Endotypes.** Schimunek L, Lindberg H, Cohen M, Namas RA, Mi Q, Yin J, Barclay D, El-Dehaibi F, Abboud A, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *Frontiers in Immunology* November 2020
- 4.1.2. MPPED2 Polymorphism Is Associated With Altered Systemic Inflammation and Adverse Trauma Outcomes.** Schimunek L, Namas RA, Yin J, Liu D, Barclay D, El-Dehaibi F, Abboud A, Cohen M, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *Frontiers in Genetics* November 2019
- 4.1.3. Quality Control Measures and Validation in Gene Association Studies: Lessons for Acute Illness.** Cohen M, Lamparello AJ, Schimunek L, El-Dehaibi F, Namas RA, Xu Y, Kaynar AM, Billiar TR, Vodovotz Y. *Shock* Juli 2019
- 4.1.4. An Aging-Related Single-Nucleotide Polymorphism is Associated with Altered Clinical Outcomes and Distinct Inflammatory Profiles in Aged Blunt Trauma Patients.** Lamparello AJ, Namas RA, Schimunek L, Cohen M, El-Dehaibi F, Yin J, Barclay D, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *Shock* Juli 2019
- 4.1.5. A computational analysis of dynamic, multi-organ inflammatory crosstalk induced by endotoxin in mice.** Zamora R, Korff S, Mi Q, Barclay D, Schimunek L, Zucca R, Arsiwalla XD, Simmons RL, Verschure P, Billiar TR, Vodovotz Y. *PLoS Computational Biology* November 2018

- 4.1.6. Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma. Serve R, Sturm R, Schimunek L, Störmann P, Heftrig D, Teuben MPJ, Oppermann E, Horst K, Pfeifer R, Simon TP, Kalbas Y, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. *Frontiers Immunology* März 2018**
- 4.1.7. An Enrichment Strategy Yields Seven Novel Single Nucleotide Polymorphisms Associated With Mortality and Altered Th17 Responses Following Blunt Trauma. Schimunek L, Namas RA, Yin J, Liu D, Barclay D, El-Dehaibi F, Abboud A, Lindberg H, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *Shock* März 2018**
- 4.1.8. Leukotriene B4 indicates lung injury and on-going inflammatory changes after severe trauma in a porcine long-term model. Störmann P, Auner B, Schimunek L, Serve R, Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Köhler K, Hildebrand F, Wutzler S, Pape HC, Marzi I, Relja B; This study was performed within the study consortium of the TREAT Research Group. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* Dezember 2017**
- 4.1.9. Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model. Schimunek L, Serve R, Teuben MPJ, Störmann P, Auner B, Woschek M, Pfeifer R, Horst K, Simon TP, Kalbitz M, Sturm R, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. *PLoS One* November 2017**
- 4.1.10. Impaired Surface Expression of HLA-DR, TLR2, TLR4, and TLR9 in Ex Vivo-In Vitro Stimulated Monocytes from Severely Injured Trauma Patients. Heftrig D, Sturm R, Oppermann E, Konradowitz K, Jurida K, Schimunek L, Woschek M, Marzi I, Relja B. *Mediators Inflammation* Februar 2017**

Bisherige Präsentation der Forschungsergebnisse auf Kongressen

4.1.11. A Single Nucleotide Polymorphism in MPPED2 is Associated with Increased Requirement for Mechanical Ventilation and Mortality.

Schimunek L, Namas RA, Yin J, Liu D, Barclay D, El-Dehaibi F, Abboud A, Cohen M, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *40th annual Conference on Shock* June 2017

4.1.12. Decreased TLR2 expression on porcine monocytes is associated with their reduced phagocytic activity in the early post-traumatic phase.

Schimunek L, Serve R, Teuben MPJ, Störmann P, Auner B, Woschek M, Pfeifer R, Horst K, Simon TP, Kalbitz M, Sturm R, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. *20. Chirurgische Forschungstage* September 2016

Bisherige Posterpräsentationen der Forschungsergebnisse auf Kongressen

- 4.1.13. A Single Nucleotide Polymorphism in MPPED2 is Associated with Initial Hypo-Inflammation and Adverse Clinical Outcomes after Trauma.** Schimunek L, Namas RA, Cohen M, Yin J, Barclay D, El-Dehaibi F, Abboud A, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. *McGowan Institute: Scientific Retreat March 2018*
- 4.1.14. Acute Lung Injury after Blunt Chest Trauma and Hemorrhagic Shock is Reduced by Ethyl Pyruvate via Inhibition of NF-kappa B and HMGB1.** Perl M, Wagner N, Franz N, Dieteren S, Schimunek L, Marzi I, Relja B. *40th annual Conference on Shock June 2017*
- 4.1.15. Decreased TLR2 Expression on Porcine Monocytes in the Early Post-Traumatic Phase is Associated with their Impaired Maturation and Reduced Phagocytic.** Schimunek L, Serve R, Störmann P, Woschek M, Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Marzi I, Relja B. *40th annual Conference on Shock June 2017*
- 4.1.16. A Computational Analysis of Dynamic, Multi-Organ Inflammation induced by Endotoxin in Mice.** Zamora R, Korff S, Barclay D, Yin J, Schimunek L, Billiar TR, Vodovotz Y. *40th annual Conference on Shock June 2017*
- 4.1.17. Verringerte TLR2-Expression auf porcinen Monozyten ist assoziiert mit einer verminderten Phagozytoseaktivität in der frühen posttraumatischen Phase.** Schimunek L, Serve R, Störmann P, Auner B, Simon TP, Horst K, Pfeifer R, Haug AT, Pape HC, Marzi I, Relja B. *Science Day des Fachbereichs Medizin der Goethe Universität Frankfurt July 2016*

Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation

In der Zeit als Doktorand im wissenschaftlichen Labor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik Frankfurt war ich Teil der Arbeitsgruppe Polytrauma, welche sich schwerpunktmäßig mit der Charakterisierung und Modulation der posttraumatischen Immunreaktion nach Polytrauma auseinandersetzt. Die hier im Manuskript dargelegte Arbeit entstand als Teil der TREAT-Research Group, ein interdisziplinäres und multizentrisches Forschungsnetzwerk, und half bei der Etablierung eines experimentellen Polytraumamodells an Großtieren. Hieran sollen weiterhin neue diagnostische und therapeutische Verfahren nach schwerem Trauma evaluiert werden.

Die praktische Durchführung der Versuche erfolgte täglich nach festgelegtem Schema im wissenschaftlichen Labor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik RW Aachen. Da diese mit hohem Arbeitsaufwand verbunden waren und die Proben für mehrere Projekte verwendet wurden, arbeitete ich eng mit Raphael Serve zusammen. Unterstützt wurden wir hierbei von weiteren Mitgliedern des TREAT-Research Group, namentlich Herr Dr. Philipp Störmann, Frau Dr. Birgit Auner, Herr Dr. Mathias Woschek, Herr Dr. Roman Pfeifer, Herr Dr. Klemens Horst, Herr Dr. Tim Simon, Frau Dr. Miriam Kalbitz und Frau Dr. Ramona Sturm, welche die Induktion des Polytraumas am Tier, die anschließende Überwachung, die Entnahme der Proben und das Sacrifice übernahmen. Weitere Unterstützung erhielten wir von medizinisch-technischen Laborassistentinnen des Forschungslabors Frankfurt bei der Aufarbeitung der gewonnenen Proben.

Weitere Schwerpunkte der im Rahmen des Projektes entstandenen Arbeiten waren die posttraumatische Dynamik von regulatorischen T-Zellen, das Auftreten von mikroRNA, sowie lokale Entzündungsgeschehnisse und Wundheilung.

Zu Beginn der Arbeit half ich an der Etablierung des von Frau Prof. Dr. Borna Relja erstellten Studiendesign mit der zum Teil für die Projekte neu eingeführten Methodik. Zusammen mit Raphael Serve war ich für die im Methodik-Teil beschriebenen tägliche Verarbeitung und Aufbereitung der Blutentnahmen der Schweine verantwortlich. Ein Großteil der Arbeit stellte die tägliche Durchführung der Versuche und Messungen dar. Alle im Manuskript genannten Methoden und Messungen führte ich selbstständig zusammen mit Raphael Serve durch. Im selben Umfang war ich auch an der Durchführung weiterer molekularbiologischer Methoden im Rahmen der oben erwähnten Forschungsprojekte

beteiligt. Bei den täglich durchzuführenden Versuchen sind hier insbesondere Zellkulturen, Zellseparation, Konservierung von Gewebeproben, Durchflusszytometrie am *BD FACS Canto 2™*, Proliferationsassays, Antigenneutralisierung mittels Antikörper und ELISA zu nennen.

Zusammen mit Frau PD Dr. Borna Relja und Dr. Michel Teuben erarbeitete ich die „Gating“-Strategie am FACS Canto II. Die Erfassung und das Zusammentragen der gewonnenen Daten wurden von mir vorgenommen. Das veröffentliche Manuskript wurde selbstständig von mir verfasst. Korrekturen und Hilfestellung bei statistischen und den graphischen Auswertungen erhielt ich von Herrn Dr. Nils Wagner und Frau Prof. Dr. Borna Relja. Diese wurden für die übergreifende Zusammenfassung aus der Publikation übernommen. Der Ethikantrag wurde von Frau Prof. Dr. Borna Relja erstellt. Kerstin Konradowitz und Katrin Jurida halfen bei den methodischen Auswertungen. Herr Prof. Dr. Ingo Marzi, Herr Prof. Dr. Hans-Christian Pape und Herr Prof. Dr. Frank Hildebrand haben intellektuell zum Manuskript und zur Studie beigetragen.

Publikation „Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model”

Lukas Schimunek, Rafael Serve, Michel P. J. Teuben, Philipp Störmann, Birgit Auner, Mathias Woschek, Roman Pfeifer, Klemens Horst, Tim-P. Simon, Miriam Kalbitz, Ramona Sturm, Hans-C. Pape, Frank Hildebrand, Ingo Marzi, Borna Relja

1 Department of Trauma-, Hand- and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt/Main, Germany, **2** Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Zurich, Switzerland, **3** Department of Orthopaedic Trauma, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, **4** Department of Intensive Care and Intermediate Care, RWTH Aachen University, Aachen, Germany, **5** Department of Orthopedic Trauma, Hand, Plastic, and Reconstructive Surgery, University of Ulm, Ulm, Germany

Abstract

In their post-traumatic course, trauma patients suffering from multiple injuries have a high risk for immune dysregulation, which may contribute to post-injury complications and late mortality. Monocytes as specific effector cells of the innate immunity play a crucial role in inflammation. Using their Pattern Recognition Receptors (PRRs), notably Toll-Like Receptors (TLR), the monocytes recognize pathogens and/or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and organize their clearance. TLR2 is the major receptor for particles of gram-positive bacteria, and initiates their phagocytosis. Here, we investigated the phagocytizing capability of monocytes in a long-term porcine severe trauma model (polytrauma, PT) with regard to their TLR2 expression. Polytrauma consisted of femur fracture, unilateral lung contusion, liver laceration, hemorrhagic shock with subsequent resuscitation and surgical fracture fixation. After induction of PT, peripheral blood was withdrawn before (-1 h) and directly after trauma (0 h), as well as 3.5 h, 5.5 h, 24 h and 72 h later. CD14⁺ monocytes were identified and the expression levels of H(S)LA-DR and TLR2 were investigated by flow cytometry. Additionally, the phagocytizing activity of monocytes by applying *S. aureus* particles labelled with pHrodo fluorescent reagent was also assessed by flow cytometry. Furthermore, blood samples from 10 healthy pigs were exposed to a TLR2-

neutralizing antibody and subsequently to *S. aureus* particles. Using flow cytometry, phagocytizing activity was determined. P below 0.05 was considered significant. The number of CD14⁺ monocytes of all circulating leukocytes remained constant during the observational time period, while the percentage of CD14⁺H(S)LA-DR⁺ monocytes significantly decreased directly, 3.5 h and 5.5 h after trauma. The percentage of TLR2⁺ expressing cells out of all monocytes significantly decreased directly, 3.5 h and 5.5 h after trauma. The percentage of phagocytizing monocytes decreased immediately and remained lower during the first 3.5 h after trauma, but increased after 24 h. Antagonizing TLR2 significantly decreased the phagocytizing activity of monocytes. Both, decreased percentage of activated as well as TLR2 expressing monocytes persisted as long as the reduced phagocytosis was observed. Moreover, neutralizing TLR2 led to a reduced capability of phagocytosis as well. Therefore, we assume that reduced TLR2 expression may be responsible for the decreased phagocytizing capacity of circulating monocytes in the early post-traumatic phase.

Introduction

Traumatically induced tissue damage leads to an inflammatory response. Inflammation itself is not detrimental but rather necessary for the resolution of injury and the healing progress. This complex process integrates and coordinates cytokines, chemokines and immune cells to deal with the damage.[1, 2] One attempt to characterize this inflammatory reaction was the concept of a trauma-induced hyper-inflammatory systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the counterbalancing hypo-inflammatory state (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) in the later clinical course.[1, 3] The balance between pro- and anti-inflammatory components, the SIRS-CARS paradigm, was assumed to be crucial for a successful recovery and a positive outcome.[1, 4, 5] However, the classification terms of SIRS and CARS are more than 20 years old, and are only of limited usefulness to describe the patient's current immune status because they do not always correlate well with immunofunctional parameters. Moreover, the injured tissue releases a large number of soluble factors that act on the endocrine, lymphoid and haematopoietic organs as well.[2]

Monocytes play a crucial role in the early immune response after trauma and infection. On one hand they constitute a cellular link between the innate and the adaptive immune system in case of infection, and on the other hand, are capable of recognizing pathogens or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) directed by their pattern recognition receptors (PRRs), and subsequently inactivate invading pathogens by phagocytosis.[6–8] The impact of trauma onto the function of monocytes is still not clear and can be conflicting. Anupamaa Seshadri et al. (2017) found significantly increased levels of circulating monocytes in trauma patients in the first five days after trauma compared to healthy volunteers.[9] Conversely, they found a significant depression of monocytic cytokine production (TNF- α , IL-1 β) as well as significantly impaired expression of MHC-II molecules on the surface, while the phagocytic capability was not affected over the 5 days post-trauma.[9] Heftrig et al. (2017) reported different results for the circulating levels of monocytes, while a constant depression of MHC-II expression as well as an impaired production of IL-1 β over the time course of ten days after trauma compared to healthy volunteers was observed.[10]

An important subset of PRRs are Toll-like Receptors (TLRs), of which there are 10 known types in humans.[11–13] TLR2 is the major receptor for bacterial lipoproteins, lipopeptides and lipoteichoic acid (LTA), which are common for gram-positive bacteria.[14] *S. aureus* is the most common gram-positive bacterium, which causes nosocomial infections like

pneumonia and sepsis, and is therefore highly associated with increased morbidity and mortality in chronically ill patients.[15–17] Furthermore, *S. aureus* is feared for its potential to infect wounds and enter the bloodstream after trauma or surgery.[18, 19] Phagocytosis seems to be initiated by the activation of PRRs, and in particular TLRs.[20] Several studies show an impaired phagocytic capability of monocytes in the post-traumatic course as described below.[21, 22] The data is inconsistent regarding TLR2 expression on monocytes after trauma. Perez-Barcena et al. (2010) have shown increased levels of TLR2 on monocytes in trauma patients compared to healthy volunteers over a time course of 14 days.[21] They further have shown a significantly decreased expression of TLR2 in patients who developed any infection compared to those without infections.[21] Furthermore, they have shown an impaired phagocytic activity of monocytes during the 14 days in trauma patients compared to healthy volunteers.[21] In contrast to those findings, Adib-Conquy et al. (2003) reported a constant TLR2 expression on monocytes in trauma patients at admission compared to healthy volunteers.[23] Other studies have shown an impaired expression of TLR2 in trauma patients during the first 48 hours or over a time course of 10 days after trauma compared to healthy volunteers.[10, 24]

Expression of the antigen presenting human leukocyte antigen (HLA) molecules, the cell surface proteins human major histocompatibility complex MHC-II, has been known for a long time and is well described on human monocytes from healthy volunteers.[25, 26] However, early after hemorrhagic shock or severe abdominal surgery, an impaired MHC-II expression on macrophages and specifically on monocytes has been reported.[27, 28] With regard to trauma, a decreased MHC-II expression in human monocytes after trauma has been reported.[10, 29] Nonetheless, the expression profile of H(S)LAs, the porcine MHC molecules, still remains not fully discovered, and even less is known about their behavior after trauma. MHC-I and MHC-II molecules were first observed on monocytes in pigs by Chamorro et al..[30] Raymond et al. (2005) also described the expression of MHC-II on porcine monocytes, showing an increase after adding both lipopolysaccharide (LPS) or lipoteichoic acid (LTA).[31]

To summarize, there are alterations in TLR2 and MHC-II expression, as well as modulations in phagocytizing behavior of monocytes after severe trauma, and the discrepancy between the results in previous studies is tremendous. And still, mechanisms are not discovered yet, and even less is known with regard to the experimental polytrauma model in a large animal. The varied findings in the mentioned studies above could be due to the uncontrollable nature of

trauma and its complications. Several studies only acknowledged one time point in the clinical course (e.g. admission or in the first 48 hours after admission). Furthermore, there are very few studies that combine phenotyping of immune cells with their physiological function after trauma. Therefore, in our experiment, the expression of MHC-II (SLA-DR) and TLR2 on circulating monocytes were measured in a time course of 72 hours after severe trauma in a controlled porcine long term polytrauma model. In parallel, the phagocytizing capacity of the monocytes was evaluated as one of their physiological function. Furthermore, the direct association of TLR2 with phagocytosis was analyzed. In this prospective study, we hypothesized we would observe similar results in the individual parts of the study as in previous human trauma studies with two goals: first to establish the porcine polytrauma model as a way to further investigate patients' post-traumatic physiology immune response, and second to associate our individual parts of the study to get more knowledge about mechanics behind post-traumatic immune (dys-) regulation.

Material and methods

Ethics

The experiments were authorized by a responsible government authority ("Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz": LANUV-NRW, Germany: AZ TV-Nr.: 84–02.04.2014.A265) and performed in compliance with the federal German law with regards to the protection of animals, Institutional Guidelines and the criteria in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Eighth Edition The National Academies Press, 2011). [32] In our study, we handled the animals consistently in accordance with the ARRIVE guidelines.[33] Animal experiments were performed at the Institute for Laboratory Animal Science & Experimental Surgery, RWTH Aachen University, Germany.

Animals

A total of twelve male German landrace pigs (*Sus scrofa*; 3 months old, 30 ± 5 kg) from a disease-free barrier breeding facility were included in this study. Placed in air conditioned rooms, all animals were examined by a veterinarian and allowed to acclimatize to their environment for at least 7 days prior to the experiments. The night before the experiments, the pigs were fasted but had a free access to water.

This study presents partial results obtained from a large animal porcine multiple trauma model. The model has been previously described in detail by Horst et al. [34]

Anesthesia and preparation

Animals were pre-medicated with an intramuscular (IM) application of Azaperone (StresniTM, Janssen, Germany) in a dose of 4 mg/kg. Anesthesia was induced with an intravenous injection of Propofol (3 mg/kg) followed by orotracheal intubation (7.5 ch tube, Hi-Lo LanzTM). During the study period over 72 h, anesthesia and analgesia was continuously maintained with intravenous (IV) injection of Propofol and Sufentanil at a sufficient level to prevent any periods of pain or consciousness. The animals were not awakened at any time point after the induction of polytrauma. The animals were ventilated on volume control mode (Draeger, Evita, Lübeck, Germany) with room air at a tidal volume setting of 6–8 ml/kg, positive end expiratory pressure (PEEP) of 8 mmHg (plateau pressure < 28 mmHg), and pCO₂ of 35–45 mm Hg as previously described.[34] Catheters were

aseptically inserted in multiple locations: the external jugular vein for administration of fluids, anesthesia and continuous monitoring of central venous pressure (CVP, central venous catheter 4-Lumen Catheter, 8.5 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany), the right femoral vein to induce hemorrhage (3-Lumen hemodialysis, 12.0 Fr., ArrowCatheter, Teleflex Medical, Germany) and into the femoral artery for continuous blood pressure monitoring (4.0 Fr. arterial line catheter, Vygon, Germany). A urinary catheter was also inserted in the bladder (12.0 Fr, Cystofix, Braun, Melsungen, Germany). Crystalloid fluid (Sterofundin ISO®) was used for continuous fluid management (2 ml kg/BW/h). The baseline measurements were acquired after instrumentation and calibration, prior to starting experimentation.

Induction of polytrauma

The polytrauma was induced as previously described.[34] In brief, antibiotic prophylaxis (Ceftriaxon® 2 g) was administered before surgery and after every 24 h until sacrifice. Prior to initial trauma induction, the fraction of inspired O₂ (FiO₂) was set at 0.21 and the fluid administration was reduced to 10 ml/h. At this phase, the animals were allowed to descend into a hypothermic state following hemorrhagic shock period mimicking the pre-clinical scenario. The animal was positioned on the right side and a femur fracture was induced with a bolt shot on the right hind leg (Blitz-Kerner, turbocut JOBB GmbH, Germany, 9x17, Dynamit Nobel AG, Troisdorf, Germany). After being placed back in the dorsal position, blunt thoracic trauma with a bolt shot on the right dorsal lower thorax was induced. Finally, a midline-laparotomy and uncontrolled bleeding for 30 seconds after crosswise incision of the caudal liver lobe (4.5 x 4.5 cm) was induced. Using sterile gauze-compresses the liver was packed. Pressure-controlled haemorrhagic shock using exsanguination from right femoral artery was performed until a mean arterial blood pressure (MAP) of 40 ± 5 mm Hg was reached and maintained for 90 minutes.

Resuscitation started immediately after hemorrhagic shock by adjusting FiO₂ to baseline values, and re-infusing with previously withdrawn blood and additional fluids (Sterofundin ISO®; 2 ml kg/BW/h). Rewarming was performed using forced-air warming systems until normothermia was reached (38.7–39.8°C).

After experimentation, clinical treatment of the open femur fracture was performed according to established trauma guidelines. The intensive care and complications management followed

the standardized clinical protocols according to the latest recommendations of the European Resuscitation Council and Advanced Trauma Life Support (ATLS).[35, 36] After the observational period the animals were euthanized by using potassium chloride until cardiac arrest.

Blood sampling

Blood samples were withdrawn directly after surgery in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Sarstedt, Nürnberg, Germany) before trauma induction as control at 3.5 h, 5.5 h, 24 h and 72 h after trauma. The samples were kept at room temperature until subsequent analyses.

Ex vivo in vitro whole blood stimulation for phagocytosis assay

Blood samples (40 µl) were transferred into polystyrene FACS tubes (BD Pharmingen™) and incubated with 40 µl of pH Rodo red (pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate for Phagocytosis, ThermoFisher, Germany) for 1 h at 37°C, 5% CO₂ according to the manufacturer's instructions. A negative control without *S. aureus* Red BioParticles Conjugate was included. Afterwards, 1 ml of FACS lysing solution (FACS Lysing Solution, 1:10, BD Pharmingen™, Heidelberg, Germany) was added, followed by another incubation step (10 minutes) for red blood cells lysis. Thereafter, 2 ml of phosphate buffered saline (PBS) were added and the samples were centrifuged at 800G for 8 minutes at room temperature.

Subsequently, the samples were washed with 3 ml of PBS with supplements (0.5% bovine serum albumin (BSA), FACS buffer) and centrifuged again at 800G for 8 minutes. The pellet was resuspended in 400 µl FACS buffer. The measurement was performed by flow cytometry using BD FACS Canto™ and FACS DIVA™ software (FACSCanto II, BD Biosciences). The monocyte population was discriminated by forward and sideward scatter. 300,000 monocytes were measured in each sample. The phagocytizing activity of monocytes was quantified as a percentage of cell population gated.

Ex vivo in vitro whole blood cell surface receptor analysis

Blood samples (100 µl) were incubated for 30 minutes at room temperature in darkness with mouse anti-human CD14 PE (Clone TÜK4, BD Bioscience), mouse anti-human HLA-DR PerCP-Cy5.5 (Clone HL-38, Novus Biologicals), or polyclonal rabbit anti-human TLR2 Alexa Fluor 700 (Bioss Antibodies, 5 µl). Control samples were incubated with suggested isotype controls for the settings. After incubation, 3 ml of FACS lysing solution (BD Pharmingen™) were added and incubation for 10 minutes at room temperature in darkness followed. Subsequently, the samples were centrifuged at 800G for 5 minutes at room temperature. The pellet was resuspended in 500 µl of FACS buffer. The samples were measured by flow cytometry with BD FACS Canto™ using FACS DIVA™ software (BD Biosciences). The monocytes were discriminated by gating CD14⁺ cells. 300,000 monocytes were measured at least from each sample. Unstimulated samples were measured as control.

TLR2 neutralization followed by phagocytosis assay

Blood samples (EDTA tubes, Sarstedt) from ten male Pietrain pigs (*Sus scrofa*, 6 months old, 100 ± 5 kg) from a disease-free barrier breeding facility Bundes Hybrid Zucht Programm (BHZZP) were drawn immediately after slaughtering for mechanistic studies. 50 µl were transferred into polystyrene FACS tubes (BD Pharmingen™). The samples were kept at room temperature and incubated for one hour at room temperature in darkness with the rat IgG polyclonal neutralizing human TLR2 (Invivogen) (20 µg/ml). Control samples were incubated for one hour at room temperature in darkness with the normal rat IgG control PAb antibody (Invivogen) (20 µg/ml) or without antibodies (ctrl). In the following, 40 µl of each sample were incubated with pH Rodo red bioparticles (pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate for Phagocytosis, ThermoFisher, Germany) according to the manufacturer's instructions to determine the phagocytizing capacity of cells (see protocol above). The monocyte population was discriminated by forward and sideward scatter. 300,000 monocytes were measured in each sample. The phagocytizing activity of monocytes was quantified as a percentage of cell population gated.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed employing GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA). D'Agostino-Pearson normality test was applied to test the normality of data. To compare the differences between the groups, the matched-pair statistical analysis was performed by using repeated measures ANOVA (Friedman test) with a Dunn's post-hoc test. A p value of less than 0.05 was considered significant. Data are given as mean \pm standard error of the mean (sem).

Results

Ratio of CD14+ monocytes to leukocytes

Gating strategy is shown in Fig 1. The proportion of peripheral CD14+ monocytes out of the total leukocytes was $5.7 \pm 0.3\%$ before trauma (Fig 2A). There were no significant changes compared to the initial value over the post-traumatic course of 72h (after surgery: $5.3 \pm 0.3\%$, 3.5 h: $6.3 \pm 0.2\%$, 5.5 h: $6 \pm 0.2\%$, 24 h: $5.1 \pm 0.3\%$, and 72 h: $5.9 \pm 0.3\%$, Fig 2A).

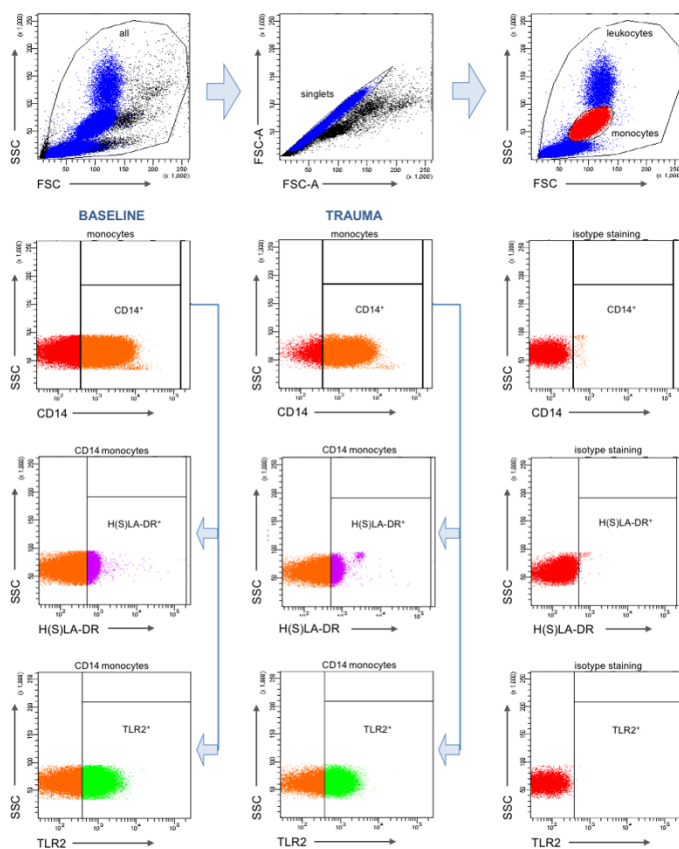


Fig 1. Gating strategy for flow cytometric analyses.

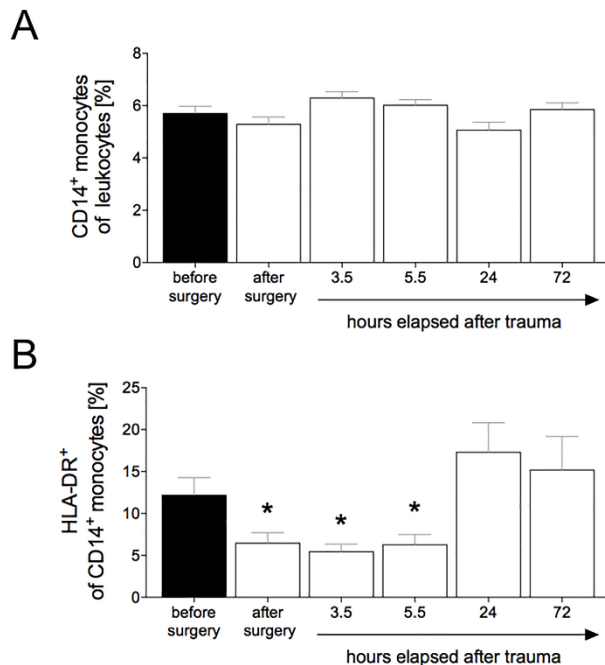


Fig 2. The ratio of porcine peripheral CD14⁺ monocytes out of total leukocytes was determined in percent.

(A) Monocytes were characterized by their CD14 surface expression by flow cytometry. The percentage of HLA-DR⁺ expressing porcine peripheral CD14⁺ monocytes of total leukocytes was determined (B). Cells were characterized by CD14 and HLA-DR expression by flow cytometry. Blood samples were collected from polytraumatized pigs (n = 12) before trauma as baseline, immediately after surgery/trauma, 3.5 h, 5.5 h, 24 h and 72 h after trauma. Data are shown as mean ± sem. *: p < 0.05 vs. baseline (before surgery).

Surface expression of HLA-DR+ on CD14+ monocytes

The proportion of peripheral HLA-DR expressing CD14⁺ monocytes out of total leukocytes was initially 11.6 ± 2.2% (Fig 2B). The ratio was significantly lowered directly after surgery compared to baseline (6.5 ± 1.3% vs. 11.6 ± 2.2%, p < 0.05, Fig 2B). The ratio was also significantly decreased 3.5 h (5.5 ± 0.9%) and 5.5 h (6.3 ± 1.2%) after trauma compared with values obtained before trauma (11.6 ± 2.2%, p < 0.05, Fig 2B). 24 h and 72 h post-trauma, the population reached levels comparable to controls (17.3 ± 3.5% and 15.2 ± 4%, respectively, Fig 2B).

Surface expression of TLR2 on CD14⁺ monocytes

Before trauma 45.5 ± 1.8% of CD14⁺ monocytes were expressing TLR2 on their cell surface (Fig 3A). Directly after surgery, the CD14⁺ monocytes expressing TLR2 dropped significantly compared to baseline (39.3 ± 1% vs. 45.5 ± 1.8%, p <0.05, Fig 3A). CD14⁺ monocytes expressing TLR2 remained significantly lowered 3.5 h (39.9 ± 1.3%) and 5.5 h (40 ± 1.3%) after trauma compared to values before surgery (p <0.05, Fig 3A). 24 h and 72 h after trauma, CD14⁺ monocytes expressing TLR2s reached levels comparable to control values (42.5 ± 1.5% and 43 ± 1.8%, respectively, Fig 3A).

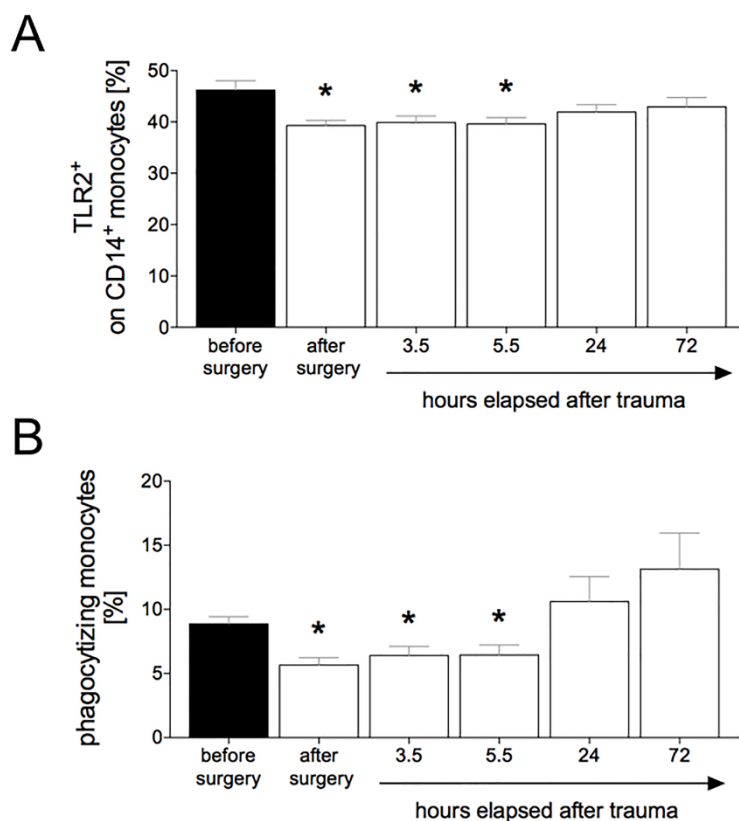


Fig 3. The percentage of TLR2⁺ expressing porcine peripheral monocytes out of total CD14⁺ monocytes was determined.

(A) Cells were characterized by CD14 and TLR2 expression by flow cytometry. Blood samples were collected from polytraumatized pigs (n = 12) before trauma as baseline, immediately after surgery/trauma, 3.5 h, 5.5 h, 24 h and 72 h after trauma. The percentage of phagocytizing porcine peripheral monocytes out of total monocytes was determined (B). Whole blood samples were incubated with pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate. The measurement was performed by flow cytometry. Monocytes were discriminated by forward and sideward scatter. Data are shown as mean ± sem. *: p <0.05 vs. baseline (before surgery). Data are shown as mean ± sem. *: p <0.05 vs. baseline (before surgery).

Phagocytic activity of monocytes after trauma

8.9 ± 0.6% of monocytes were phagocytizing before trauma (Fig 3B). After surgery, phagocytic activity was significantly decreased compared to baseline (5.7 ± 0.6% vs. 8.9 ± 0.6%, p <0.05, Fig 3B). The phagocytizing activity of monocytes remained significantly reduced at 3.5 h (6.4 ± 0.7%) and 5.5 h (6.5 ± 0.8%) after trauma compared to data before trauma (8.89 ± 0.6%, p <0.05, Fig 3B). The phagocytic capability of the monocytes recovered at 24 h and 72 h after trauma and reached values comparable to controls (10.6 ± 2% and 13.1 ± 2.8%, respectively, vs. 8.9 ± 0.6%) (Fig 3B).

Phagocytic activity of monocytes after TLR2 neutralization

4.4 ± 0.8% of monocytes without prior TLR2 neutralization were phagocytizing *S. aureus* bioparticles (ctrl, Fig 4). After TLR2 neutralization (nAB TLR2), the phagocytic activity dropped significantly compared to ctrl (2.9 ± 0.2% vs. 4.4 ± 0.8%, p <0.05, Fig 4). The monocytes incubated with the control antibody (nAB ctrl) have shown similar levels of phagocytosis as the ctrl group (4.2 ± 0.6% vs. 4.4 ± 0.8%, Fig 4).

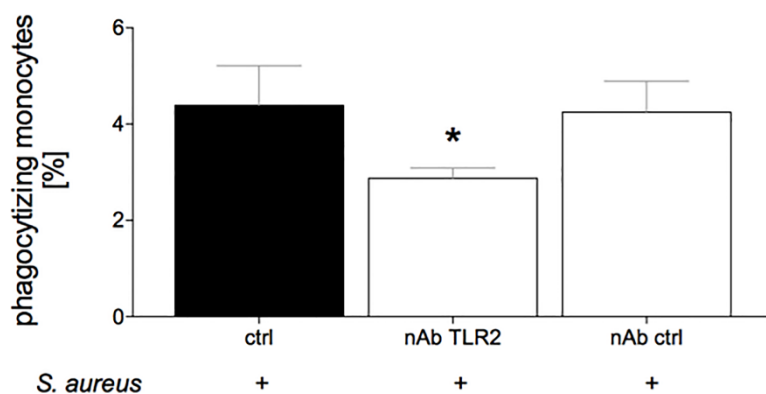


Fig 4. The percentage of phagocytizing porcine peripheral monocytes out of total monocytes was determined.

Blood samples were collected from healthy pigs (n = 10). Whole blood samples were incubated in the first step with TLR2 neutralizing (nAB TLR2) or control (nAB ctrl) antibody, or without antibody (ctrl). In the next step, the samples were incubated with pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate. The measurement was performed by flow cytometry. Monocytes were discriminated by forward and sideward scatter. Data are shown as mean ± sem. *: p <0.05 vs. ctrl.

Discussion

Monocytes play a pivotal role in inflammation and show massive functional modulations in trauma patients e.g. in phagocytosis, their maturation and TLR expression or impaired cytokine secretion after ex vivo stimulation with endotoxin.[21, 37–39] Several clinical studies and experimental in vivo studies in small animals have shown an altered surface expression of TLR and HLA-DR as well as an impaired phagocytic activity after severe trauma. Despite numerous studies in the last decades, the importance of functional modulations of monocytes after trauma is still not fully understood.

Porcine monocytes as demonstrated by Fairbairn et al. (2013) express CD14.[40] Although, Fairbairn et al. used another clone of the monoclonal mouse anti pig CD14 antibody (Clone: MIL2), we confirmed (clone: TÜK4) that the porcine model is useful for studying the in vivo function of CD14 and monocytes. Furthermore, we could show that the blood level of circulating CD14 positive monocytes does not change significantly over a time course of 72 hours after trauma in a porcine model.

In general, little is known about the expression of H(S)LA, the porcine MHC molecules on monocytes. Chamorro et al. (2004) discovered SLA-I, SLA-II-DQ and SLA-II-DR molecules on porcine monocytes, and Raymond et al. (2005) observed the expression of MHC-II on porcine monocytes and their increase after treatment with both lipopolysaccharide (LPS) or lipoteichoic acid (LTA) by using flow cytometry.[30, 31] Further analyses have shown that porcine SLA-1*0401 and human leukocyte antigen (HLA) class I HLA-A*0101 can present the same peptides, but in different conformations, demonstrating cross-species epitope presentation.[41] This is so far important, as it has been verified before that human anti-HLA-DR recognizes porcine leukocyte antigens. With regard to the relevance of its expression, Monneret et al. (2006) could correlate the persisting lower expression of MHC-II molecules on human monocytes in patients suffering infections who had increased mortality rates, while survivors have shown an increasing MHC-II expression.[42] The authors concluded that the expression of MHC-II may constitute a highly potent marker for the outcome.[42] Regarding trauma, a significantly decreased expression of MHC-II molecules on human monocytes was reported, however, this phenomenon did not correlate with post-injury infections.[10, 29]. In line with those studies, our study shows the post-traumatic maturation of porcine monocytes was investigated for the first time. We could demonstrate a decreased MHC-II expression on porcine monocytes in the early post-traumatic course with a recovery phase after 24 hours.

Due to the limited experimental design with regard to the duration of the observational period, we did not evaluate the clinical course, and therefore, we are unable to make a statement regarding the influence of the observed decrease in H(S)LA-DR positive monocytes on the possibly emerging complications in our model. Nonetheless, our findings confirm the data from trauma patients, and indicate at a lower stage of maturation of monocytes with subsequently impaired function after trauma. The relevance of this findings remains to be evaluated in further studies.

The activation of monocytes is triggered via TLRs. Thus, despite their maturation as described above, considering functional alterations of monocytes after trauma, it seems reasonable to analyze the TLR expression on monocytes after trauma. The genes of 10 porcine TLRs (TLR1-10) are described and listed in the public nucleotide database. So far, however, little is known about their expression on porcine monocytes and little with regard to porcine severe trauma. Liu et al. (2009) demonstrated the gene expression for TLR2, 3, 4, 7, 8 and 9, and have shown a significant upregulation ex vivo in vitro for TLR2, 4 and 8, after infection in porcine peripheral blood mononuclear cells.[43] Interestingly, in surgical trauma patients increased TLR2 in comparison to the control group was reported.[44] Lendemans et al. (2007), however, have shown a significantly downregulated expression of TLR2 receptor on monocytes within the first 48 hours after severe trauma in patients.[24] This is in line with data reported here, confirming the early decrease in TLR2 expressing monocytes immediately after trauma, indicating that the porcine trauma model represents the changes in TLR2 expressing monocytes, which were observed in trauma patients.

In general, nothing is known about the post-traumatic behavior of porcine monocytes so far and also their phagocytic activity after trauma was investigated for the first time in a porcine trauma model. The expression of TLR2 on CD14⁺ monocytes was decreased simultaneously with the phagocytic activity, in particular directly after surgery, 3.5 and 5.5 hours after trauma. Subsequently, these findings led us to the hypothesis that the impaired TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity of *S. aureus* particles in the early post-traumatic course. Previous publications already suggested the dependence of phagocytosis on PRRs and supported our hypothesis. Attempts to correlate the TLR2 expression with the diminished immune activity on monocytes, such as phagocytosis after severe trauma are limited. Sturm et al. (2017) have shown a decreased phagocytic activity of human monocytes in the first two days after severe trauma, with a recovery beginning at post-injury day 3.[22] Data from this study confirm the early diminished

phagocytosis, which was observed in patients after trauma as well. There is, however, apparently a faster recovery in porcine monocytes as compared to human samples after trauma. Freeman and Grinstein (2014) addressed the association of TLRs to the phagocytic activity before.[20] In brief, TLR activation leads to a so called inside-out activation, increasing the mobility of phagocytic receptors on the cell surface/cell membrane, thereby facilitating the engulfment of particles/pathogens.[20] In another in vitro model, it has been demonstrated that specific phagocytosis probably involved recognition of cell wall components that requires participation of a TLR2-dependent pathway.[45, 46] Human peripheral blood monocytes, treated with the TLR2 agonist have shown significantly enhanced phagocytic ability in vitro.[47] Consistently, our results have shown as well that early diminished TLR2 expression in porcine monocytes was associated with a simultaneously decreased phagocytizing activity after trauma. To define the role of TLR2 in the phagocytosis response of monocytes against *S. aureus*, we investigated the phagocytosis in TLR2-neutralized monocytes obtained from healthy pigs. We could confirm our hypothesis, TLR2 neutralization reduced the phagocytizing rate. Taken together, our data suggest that the decrease of the ratio of TLR2 positive monocytes after trauma may be responsible for the decrease in monocyte phagocytosis, which we have observed in the present study. Combined with results of previous publications, we assume that TLR2 might probably mediate the phagocytizing capability of monocytes for certain bacterial particles in the porcine polytrauma model.

Despite new insights in the porcine cellular physiology, our study has several limitations. First, the very low phagocytizing capacity of the cells may possibly be caused by the use of EDTA and not heparin blood for the assay. Furthermore, it remains to be elucidated, if the early phagocytosis-depression of monocytes will influence the outcome after trauma. Due to the limited observational period (72 hours), our findings cannot be linked to defined outcomes like infections, sepsis, length of stay on ICU or requirement for ventilation which occur way after 72h. Several studies suggest intracellular processes as reason for an impaired post-traumatic function of monocytes. There are different mechanisms of TLR regulation, which have not been addressed here, such as localization and trafficking between the Golgi and the cell surface, interactions of the transmembrane domain or TLR adapter molecules as crucial targets of trauma causing alteration of TLR expression and function.[48, 49] The same applies for the phagocytic activity of monocytes. Seshadri et al. observed a consistent phagocytic activity of *S. aureus* despite an impaired TLR2 and MHC-II expression.[9] The

authors concluded the reduced TLR2 expression can be compensated by other molecules involved in the regulation of phagocytosis. Another limitation of our study is clearly the use of different subspecies of pigs (German Landrace vs Petrain) in different parts of the study. Additionally, to the different subspecies, the “polytrauma-pigs” had to undergo pre-trauma procedures (anesthesia and multiple catheters as described), which might have led to a priming of the immune cells, leading to an increased phagocytic activity before trauma compared to the “healthy” pigs. In future studies, different parts should be executed with specimen of the same subspecies receiving same treatments. However, the results in both parts of our study build on one another and the results and trends are reasonable. Additionally, other populations of monocytes (weakly CD14-positive, CD16-positive cells, etc.) have not been included in the analyses.[50–52]

Our study must be regarded as a first approach to explore such phenomena, if the post-traumatic cellular physiology of pigs is comparable to the one of humans. We started experimentation for monocytes and our findings are promising. However, further studies must be done for different cell lines, even for the other mentioned populations of monocytes in order to truly establish a porcine large animal polytrauma model.

In summary, our results demonstrate that porcine monocytes, undergoing polytrauma, had a decreased TLR2 expression and an impaired maturation as well as a reduced bacterial clearance via phagocytosis in the early post-traumatic course. The deranged phagocytizing capacity is highly associated with the reduced TLR2 expression on monocytes, and may provide a new therapeutic target to improving phagocytosis during infection. Moreover, this porcine model is representative for the initially suppressed function of monocytes after trauma in humans.

Conclusions

The ratio of porcine monocytes on all leukocytes does not change significantly over the post-traumatic course.

- Porcine monocytes fail in maturation in the early post-traumatic course.
- Porcine monocytes have a decreased expression of TLR2 in the early post-traumatic course.
- Porcine monocytes have an impaired phagocytic activity in the early post-traumatic course.
- Impaired phagocytizing function of monocytes is closely associated with their reduced TLR2 expression.

Acknowledgments

We thank Kerstin Kontradowitz and Katrin Jurida for the outstanding technical assistance. Furthermore, the authors thank Yannik Kalbas and Hannah Lüken for their assistance in conducting the animal experiments. We also thank Thaddeus Stopinski for his remarkable support during the experimentation. Project no. S-14-14P was supported by the Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) Foundation. This study was performed within the study consortium of the TREAT Research Group. Thanks to all members of the TREAT research group.

TREAT Research Group: B. Auner¹, P. Störmann¹, B. Relja¹, I. Marzi¹, T-P. Simon², G. Marx², A. Haug³, L. Egerer³, M. v. Griensven³, M. Kalbitz⁴, M. Huber-Lang⁴, R. Tolba⁵, K. Reiss⁶, S. Uhlig⁶, K. Horst⁷, M. Teuben⁸, R. Pfeifer⁸, Y. Kalbas⁸, H. Lüken⁷, H.C. Pape⁸, F. Hildebrand⁷

1 Department of Trauma-, Hand- and Reconstructive Surgery, University Hospital Frankfurt, Goethe University, Frankfurt/Main, Germany; **2** Department of Intensive Care and Intermediate Care, RWTH Aachen University, Germany; **3** Department of Trauma Surgery, Technical University Munich, Germany; **4** Department of Orthopedic Trauma, Hand-, Plastic-, and Reconstructive Surgery, University of Ulm, Germany; **5** Institute for Laboratory Animal Science and Experimental Surgery, RWTH Aachen University, Germany; **6** Institute of Pharmacology and Toxicology, RWTH Aachen University, Germany; **7** Department of Orthopaedic Trauma, RWTH Aachen University, Germany; **8** Department of Orthopaedic Trauma Surgery, University Hospital Zurich, University of Zurich, Switzerland.

References

- (1) Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. [Pathophysiology of multiple trauma: intensive care medicine and timing of treatment]. *Chirurg*. 2013;84(9):753–8
- (2) Islam MN, Bradley BA, Ceredig R. Sterile post-traumatic immunosuppression. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(4):e77
- (3) Rouget C, Girardot T, Textoris J, Monneret G, T RI, Venet F. Biological markers of injury-induced immunosuppression. *Minerva Anesthesiol*. 2016
- (4) Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996;24(7):1125–8
- (5) Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. *Crit Care Med*. 2004;32(11):2234–40
- (6) Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester DP, Hume DA. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol*. 2011;89(6):855–71
- (7) Turner JD, Bourke CD, Meurs L, Mbow M, Dieye TN, Mboup S, et al. Circulating CD14^{bright}CD16⁺ 'intermediate' monocytes exhibit enhanced parasite pattern recognition in human helminth infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2817
- (8) Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1–3):41–57
- (9) Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, et al. Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach. *Crit Care Med*. 2017
- (10) Heftrig D, Sturm R, Oppermann E, Konradowitz K, Jurida K, Schimunek L, et al. Impaired Surface Expression of HLA-DR, TLR2, TLR4, and TLR9 in Ex Vivo-In Vitro Stimulated Monocytes from Severely Injured Trauma Patients. *Mediators Inflamm*. 2017
- (11) Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(4):621–5
- (12) Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):169–76
- (13) Hornef MW, Henriques-Normark B, Normark S. The function and biological role of toll-like receptors in infectious diseases: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(3):304–12

- (14) Hanzelmann D, Joo HS, Franz-Wachtel M, Hertlein T, Stevanovic S, Macek B, et al. Toll-like receptor 2 activation depends on lipopeptide shedding by bacterial surfactants. *Nat Commun.* 2016;7:12304
- (15) Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest.* 2005;128(6):3854–62
- (16) Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520–32
- (17) Castillo JS, Leal AL, Cortes JA, Alvarez CA, Sanchez R, Buitrago G, et al. Mortality among critically ill patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia: a multicenter cohort study in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2012;32(5):343–50
- (18) Humphreys H. Staphylococcus aureus: the enduring pathogen in surgery. *Surgeon.* 2012;10(6):357–60
- (19) Sirijatuphat R, Siritongtaworn P, Sripojtham V, Boonyasiri A, Thamlikitkul V. Bacterial contamination of fresh traumatic wounds at Trauma Center, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2014;97 Suppl 3:S20–5
- (20) Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2014;262(1):193–215
- (21) Perez-Barcena J, Regueiro V, Crespi C, Pierola J, Oliver A, Llompарт-Pou JA, et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 is upregulated during hospital admission in traumatic patients: lack of correlation with blunted innate immune responses. *Ann Surg.* 2010;251(3):521–7
- (22) Sturm R, Heftrig D, Mors K, Wagner N, Konradowitz K, Jurida K, et al. Phagocytizing activity of PMN from severe trauma patients in different post-traumatic phases during the 10-days post-injury course. *Immunobiology.* 2017;222(2):301–7
- (23) Adib-Conquy M, Moine P, Asehnoune K, Edouard A, Espevik T, Miyake K, et al. Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(2):158–64
- (24) Lendemans S, Kreuzfelder E, Rani M, Bayeesh E, Schade FU, Flohe SB, et al. Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. *J Trauma.* 2007;63(4):740–6
- (25) Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823
- (26) Brooks CF, Moore M. Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. *Immunology.* 1988;63(2):303–11. ; PubMed Central PMCID:

- (27)Ayala A, Perrin MM, Ertel W, Chaudry IH. Differential effects of hemorrhage on Kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine*. 1992;4(1):66–75
- (28)McHoney M, Klein NJ, Eaton S, Pierro A. Decreased monocyte class II MHC expression following major abdominal surgery in children is related to operative stress. *Pediatr Surg Int*. 2006;22(4):330–4
- (29)Vester H, Dargatz P, Huber-Wagner S, Biberthaler P, van Griensven M. HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. *Eur J Med Res*. 2015;20:84
- (30)Chamorro S, Revilla C, Gomez N, Alvarez B, Alonso F, Ezquerro A, et al. In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology*. 2004;209(1–2):57–65
- (31)Raymond CR, Wilkie BN. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;107(3–4):235–47
- (32)Worlein JM, Baker K, Bloomsmith M, Coleman K, Koban TL. The Eighth Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011); Implications for Behavioral Management. *Am J Primatol*. 2011;73:98
- (33)Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412
- (34)Horst K, Simon TP, Pfeifer R, Teuben M, Almahmoud K, Zhi Q, et al. Characterization of blunt chest trauma in a long-term porcine model of severe multiple trauma. *Sci Rep*. 2016;6:39659
- (35)Subcommittee A, American College of Surgeons' Committee on T, International Awg. Advanced trauma life support (ATLS(R)): the ninth edition. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;74(5):1363–6
- (36)Bossaert L O'Connor RE, Arntz HR, Brooks SC, Diercks D, Feitosa-Filho G, et al. Part 9: Acute coronary syndromes: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation*. 2010;81 Suppl 1:e175–212
- (37)Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg*. 1990;77(2):204–7

- (38)Keel M, Schrengenberger N, Steckholzer U, Ungethum U, Kenney J, Trentz O, et al. Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *J Trauma*. 1996;41(3):430–7; discussion 7–8
- (39)Relja B, Horstmann JP, Konradowitz K, Jurida K, Schaible A, Neunaber C, et al. Nlrp1 inflammasome is downregulated in trauma patients. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(12):1391–400
- (40)Fairbairn L, Kapetanovic R, Beraldi D, Sester DP, Tuggle CK, Archibald AL, et al. Comparative analysis of monocyte subsets in the pig. *J Immunol*. 2013;190(12):6389–96
- (41)Zhang N, Qi J, Feng S, Gao F, Liu J, Pan X, et al. Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1 0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. *J Virol*. 2011;85(22):11709–24
- (42)Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175–83
- (43)Liu CH, Chaung HC, Chang HL, Peng YT, Chung WB. Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*. 2009;136(3–4):266–76
- (44)Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Efron PA, Kinoshita M, Hiraide H, et al. Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clin Immunol*. 2006;119(2):180–7
- (45)Dominguez-Punaro Mde L, Segura M, Contreras I, Lachance C, Houde M, Lecours MP, et al. In vitro characterization of the microglial inflammatory response to *Streptococcus suis*, an important emerging zoonotic agent of meningitis. *Infect Immun*. 2010;78(12):5074–85
- (46)Zheng H, Punaro MC, Segura M, Lachance C, Rivest S, Xu J, et al. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *J Neuroimmunol*. 2011;234(1–2):71–83
- (47)Shah P, Fatehchand K, Patel H, Fang H, Justiniano SE, Mo X, et al. Toll-like receptor 2 ligands regulate monocyte Fcγ receptor expression and function. *J Biol Chem*. 2013;288(17):12345–52
- (48)McGettrick AF O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):20–7

- (49) Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):1586–93
- (50) Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527–34
- (51) Ziegler-Heitbrock HW, Appl B, Kafferlein E, Loffler T, Jahn-Henninger H, Gutensohn W, et al. The antibody MY4 recognizes CD14 on porcine monocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 1994;40(5):509–14
- (52) Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol*. 2014;289(1–2):135–9

5. Literaturverzeichnis der übergreifenden Zusammenfassung

1. S. B. Deutschland, Todesursachen in Deutschland 2015. (2017).
2. N. C. f. H. Statistics, Leading causes of Death 2015. (2017).
3. C. Palmer, Major trauma and the injury severity score--where should we set the bar? *Annual proceedings. Association for the Advancement of Automotive Medicine* **51**, 13-29 (2007).
4. H. Tohira, I. Jacobs, D. Mountain, N. Gibson, A. Yeo, Comparisons of the Outcome Prediction Performance of Injury Severity Scoring Tools Using the Abbreviated Injury Scale 90 Update 98 (AIS 98) and 2005 Update 2008 (AIS 2008). *Annals of advances in automotive medicine. Association for the Advancement of Automotive Medicine. Annual Scientific Conference* **55**, 255-265 (2011).
5. K. Almahmoud, R. A. Namas, O. Abdul-Malak, A. M. Zaaqoq, R. Zamora, B. S. Zuckerbraun, J. Sperry, A. B. Peitzman, T. R. Billiar, Y. Vodovotz, Impact of Injury Severity on Dynamic Inflammation Networks Following Blunt Trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* **44**, 101-109 (2015).
6. S. Wutzler, T. Lustenberger, B. Relja, M. Lehnert, I. Marzi, [Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* **84**, 753-758 (2013).
7. R. C. Bone, Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical care medicine* **24**, 1125-1128 (1996).
8. T. M. Osborn, J. K. Tracy, J. R. Dunne, M. Pasquale, L. M. Napolitano, Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. *Critical care medicine* **32**, 2234-2240 (2004).
9. B. Relja, K. Mörs, I. Marzi, Danger signals in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg* **44**, 301-316 (2018).
10. E. Venereau, C. Ceriotti, M. E. Bianchi, DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in immunology* **6**, 422 (2015).
11. S. A. Eming, T. A. Wynn, P. Martin, Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **356**, 1026-1030 (2017).
12. L. Fairbairn, R. Kapetanovic, D. P. Sester, D. A. Hume, The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *Journal of leukocyte biology* **89**, 855-871 (2011).
13. H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* **30**, 16-34 (2011).
14. K. Takeda, S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1-14 (2005).
15. H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* **388**, 621-625 (2009).
16. R. S. Flannagan, V. Jaumouille, S. Grinstein, The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**, 61-98 (2012).
17. F. Coccolini, E. Rausa, G. Montori, P. Fugazzola, M. Ceresoli, M. Sartelli, F. Catena, L. Ansaloni, Risk Factors for Infections in Trauma Patients. *Current Trauma Reports* **3**, 285-291 (2017).
18. X. Y. Ma, L. X. Tian, H. P. Liang, Early prevention of trauma-related infection/sepsis. *Mil Med Res* **3**, 33 (2016).
19. M. Keel, N. Schregenerberger, U. Steckholzer, U. Ungethum, J. Kenney, O. Trentz, W. Ertel, Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms. *The Journal of trauma* **41**, 430-437; discussion 437-438 (1996).
20. S. Wutzler, M. Maier, M. Lehnert, D. Henrich, F. Walcher, M. Maegele, H. Laurer, I. Marzi, Suppression and recovery of LPS-stimulated monocyte activity after trauma is correlated with increasing injury severity: a prospective clinical study. *The Journal of trauma* **66**, 1273-1280 (2009).

21. B. Relja, J. P. Horstmann, K. Konradowitz, K. Jurida, A. Schaible, C. Neunaber, E. Oppermann, I. Marzi, Nlrp1 inflammasome is downregulated in trauma patients. *J Mol Med (Berl)* **93**, 1391-1400 (2015).
22. A. C. Berger, P. A. Roche, MHC class II transport at a glance. *J Cell Sci* **122**, 1-4 (2009).
23. C. Munz, Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Frontiers in immunology* **3**, (2012).
24. A. Seshadri, G. A. Brat, B. K. Yorkgitis, J. Keegan, J. Dolan, A. Salim, R. Askari, J. A. Lederer, Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach. *Critical care medicine*, (2017).
25. D. Heftrig, R. Sturm, E. Oppermann, K. Konradowitz, K. Jurida, L. Schimunek, M. Woschek, I. Marzi, B. Relja, Impaired Surface Expression of HLA-DR, TLR2, TLR4, and TLR9 in Ex Vivo-In Vitro Stimulated Monocytes from Severely Injured Trauma Patients. *Mediators Inflamm* **2017**, 2608349 (2017).
26. J. Perez-Barcelona, V. Regueiro, C. Crespi, J. Pierola, A. Oliver, J. A. Llompant-Pou, J. I. Ayestaran, J. M. Raurich, P. Marse, J. Ibanez, J. A. Bengoechea, Expression of toll-like receptors 2 and 4 is upregulated during hospital admission in traumatic patients: lack of correlation with blunted innate immune responses. *Annals of surgery* **251**, 521-527 (2010).
27. R. Sturm, D. Heftrig, K. Mors, N. Wagner, K. Konradowitz, K. Jurida, I. Marzi, B. Relja, Phagocytizing activity of PMN from severe trauma patients in different post-traumatic phases during the 10-days post-injury course. *Immunobiology* **222**, 301-307 (2017).
28. M. Adib-Conquy, P. Moine, K. Asehnoune, A. Edouard, T. Espevik, K. Miyake, C. Werts, J. M. Cavillon, Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 158-164 (2003).
29. S. Lendemans, E. Kreuzfelder, M. Rani, E. Bayeesh, F. U. Schade, S. B. Flohe, C. Waydhas, S. Flohe, Toll-like receptor 2 and 4 expression after severe injury is not involved in the dysregulation of the innate immune system. *The Journal of trauma* **63**, 740-746 (2007).
30. J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul, O. Bakke, Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* **11**, 823-836 (2011).
31. C. F. Brooks, M. Moore, Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. *Immunology* **63**, 303-311 (1988).
32. A. Ayala, Differential effects of hemorrhage on kupffer cells: decreased antigen presentation despite increased inflammatory cytokine (IL-1, IL-6 and TNF) release. *Cytokine* **4**, 66-75 (1992).
33. M. McHoney, N. J. Klein, S. Eaton, A. Pierro, Decreased monocyte class II MHC expression following major abdominal surgery in children is related to operative stress. *Pediatr Surg Int* **22**, 330-334 (2006).
34. H. Vester, P. Dargatz, S. Huber-Wagner, P. Biberthaler, M. van Griensven, HLA-DR expression on monocytes is decreased in polytraumatized patients. *Eur J Med Res* **20**, 84 (2015).
35. S. Chamorro, C. Revilla, N. Gomez, B. Alvarez, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Dominguez, In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology* **209**, 57-65 (2004).
36. C. R. Raymond, B. N. Wilkie, Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Vet Immunol Immunopathol* **107**, 235-247 (2005).
37. D. Eschbach, T. Steinfeldt, F. Hildebrand, M. Frink, K. Schöller, M. Sassen, T. Wiesmann, F. Debus, N. Vogt, E. Uhl, H. Wulf, S. Ruchholtz, H. C. Pape, K. Horst, A porcine polytrauma model with two different degrees of hemorrhagic shock: outcome related to trauma within the first 48 h. *Eur J Med Res* **20**, 73 (2015).
38. A. Subcommittee, T. American College of Surgeons' Committee on, A. w. g. International, Advanced trauma life support (ATLS(R)): the ninth edition. *The journal of trauma and acute care surgery* **74**, 1363-1366 (2013).

39. R. E. O'Connor, L. Bossaert, H. R. Arntz, S. C. Brooks, D. Diercks, G. Feitosa-Filho, J. P. Nolan, T. L. Vanden Hoek, D. L. Walters, A. Wong, M. Welsford, K. Woolfrey, Part 9: Acute coronary syndromes: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation* **122**, S422-465 (2010).
40. M. J. Hershman, W. G. Cheadle, S. R. Wellhausen, P. F. Davidson, H. C. Polk, Jr., Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *The British journal of surgery* **77**, 204-207 (1990).
41. N. Zhang, J. Qi, S. Feng, F. Gao, J. Liu, X. Pan, R. Chen, Q. Li, Z. Chen, X. Li, C. Xia, G. F. Gao, Crystal structure of swine major histocompatibility complex class I SLA-1 0401 and identification of 2009 pandemic swine-origin influenza A H1N1 virus cytotoxic T lymphocyte epitope peptides. *Journal of virology* **85**, 11709-11724 (2011).
42. G. Monneret, A. Lepape, N. Voirin, J. Bohé, F. Venet, A. L. Debard, H. Thizy, J. Bienvenu, F. Gueyffier, P. Vanhems, Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive care medicine* **32**, 1175-1183 (2006).
43. C. H. Liu, H. C. Chung, H. L. Chang, Y. T. Peng, W. B. Chung, Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary microbiology* **136**, 266-276 (2009).
44. H. Tsujimoto, S. Ono, T. Majima, P. A. Efron, M. Kinoshita, H. Hiraide, L. L. Moldawer, H. Mochizuki, Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **119**, 180-187 (2006).
45. S. A. Freeman, S. Grinstein, Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological reviews* **262**, 193-215 (2014).
46. L. Domínguez-Punaro Mde, M. Segura, I. Contreras, C. Lachance, M. Houde, M. P. Lecours, M. Olivier, M. Gottschalk, In vitro characterization of the microglial inflammatory response to *Streptococcus suis*, an important emerging zoonotic agent of meningitis. *Infection and immunity* **78**, 5074-5085 (2010).
47. H. Zheng, M. C. Punaro, M. Segura, C. Lachance, S. Rivest, J. Xu, M. Houde, M. Gottschalk, Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis. *Journal of neuroimmunology* **234**, 71-83 (2011).
48. P. Shah, K. Fatehchand, H. Patel, H. Fang, S. E. Justiniano, X. Mo, D. Jarjoura, S. Tridandapani, J. P. Butchar, Toll-like receptor 2 ligands regulate monocyte Fcγ receptor expression and function. *The Journal of biological chemistry* **288**, 12345-12352 (2013).
49. A. F. McGettrick, L. A. O'Neill, Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Current opinion in immunology* **22**, 20-27 (2010).
50. E. M. Reuven, A. Fink, Y. Shai, Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochimica et biophysica acta* **1838**, 1586-1593 (2014).
51. B. Passlick, D. Flieger, H. W. Ziegler-Heitbrock, Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527-2534 (1989).
52. H. W. Ziegler-Heitbrock, B. Appl, E. Käfferlein, T. Löffler, H. Jahn-Henninger, W. Gutensohn, J. R. Nores, K. McCullough, B. Passlick, M. O. Labeta, et al., The antibody MY4 recognizes CD14 on porcine monocytes and macrophages. *Scandinavian journal of immunology* **40**, 509-514 (1994).
53. L. Ziegler-Heitbrock, Monocyte subsets in man and other species. *Cellular immunology* **289**, 135-139 (2014).

6. Anhang

Abbildung 1

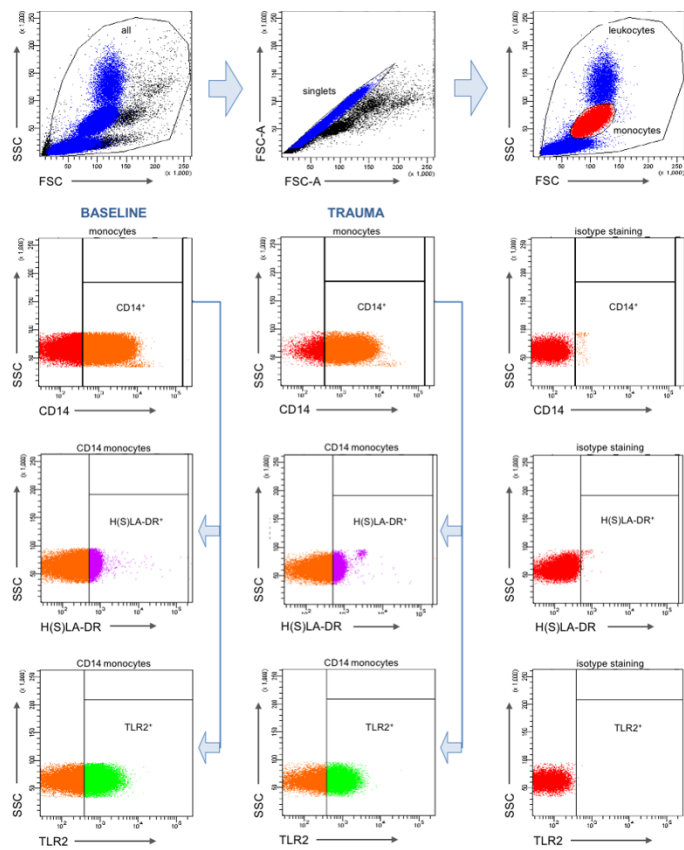
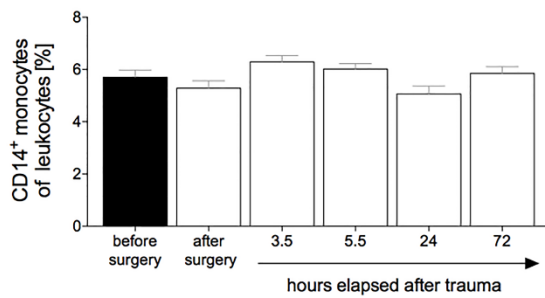


Abb. 1 Gating Strategie der Durchflusszytometrie-Analyse.

Abbildung 2

A



B

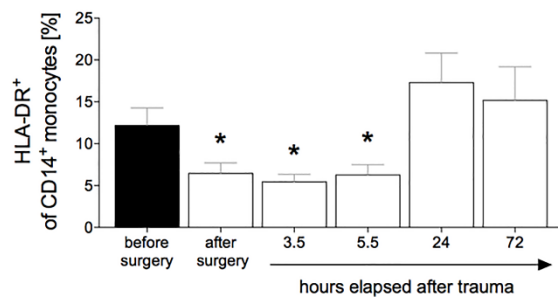


Abb. 2 (A) Bestimmung des Anteils der peripheren porcinen CD14⁺ Monozyten an den gesamten Leukozyten wurde in Prozent bestimmt. Die Monozyten wurden anhand ihrer CD14-Oberflächenexpression per Durchflusszytometrie charakterisiert.

(B) Bestimmung des prozentualen Anteils der HLA-DR⁺ exprimierenden peripheren porcinen CD14⁺ Monozyten an den gesamten Leukozyten. Die Zellen wurden per Durchflusszytometrie durch CD14- und HLA-DR-Expression charakterisiert.

Die Blutproben wurden von polytraumatisierten Schweinen (n = 12) vor Trauma als Ausgangswert, unmittelbar nach Trauma, 3,5 h, 5,5 h, 24 h und 72 h nach Trauma entnommen. Die Daten sind als Mittelwert ± Sem angegeben. *: p < 0,05 gegenüber dem Ausgangswert (vor Trauma).

Abbildung 3

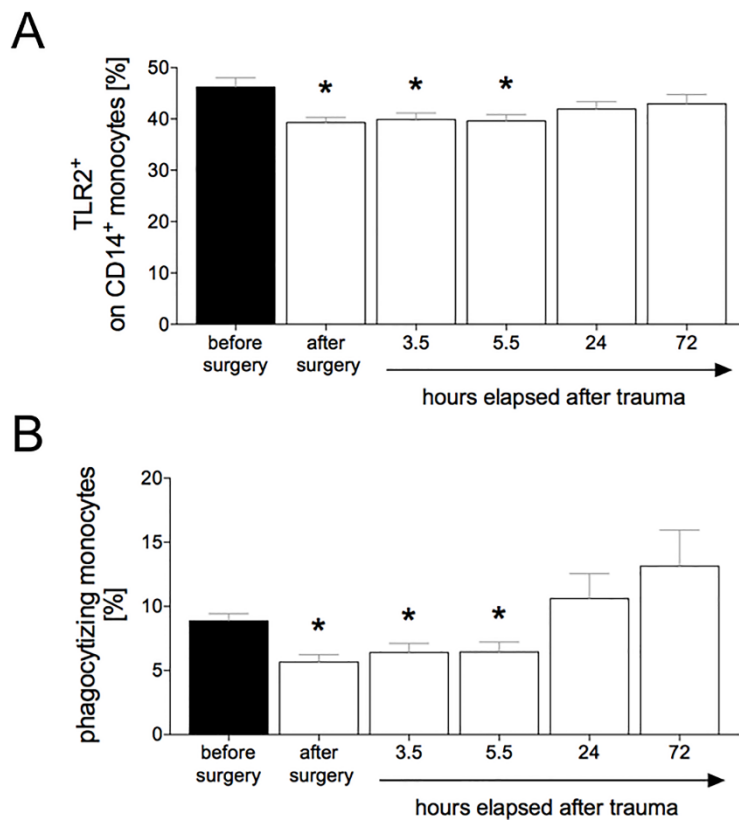


Abb. 3 (A) Der prozentuale Anteil der TLR2+ exprimierenden porcinen peripheren Monozyten an den gesamten CD14+ Monozyten wurde bestimmt. Die Zellen wurden per Durchflusszytometrie anhand der CD14- und TLR2-Expression charakterisiert.

(B) Der prozentuale Anteil der phagozytierenden peripheren Monozyten von Schweinen an den gesamten Monozyten wurde bestimmt. Die Vollblutproben wurden mit pHrodo® Red S. aureus BioParticles® Conjugate inkubiert. Die Messung erfolgte per Durchflusszytometrie. Die Monozyten wurden durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung unterschieden.

Blutproben wurden polytraumatisierten Schweinen (n = 12) vor Trauma als Ausgangswert, unmittelbar nach Trauma, 3,5 h, 5,5 h, 24 h und 72 h nach Trauma entnommen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *: p < 0,05 gegenüber dem Ausgangswert (vor Trauma).

Abbildung 4

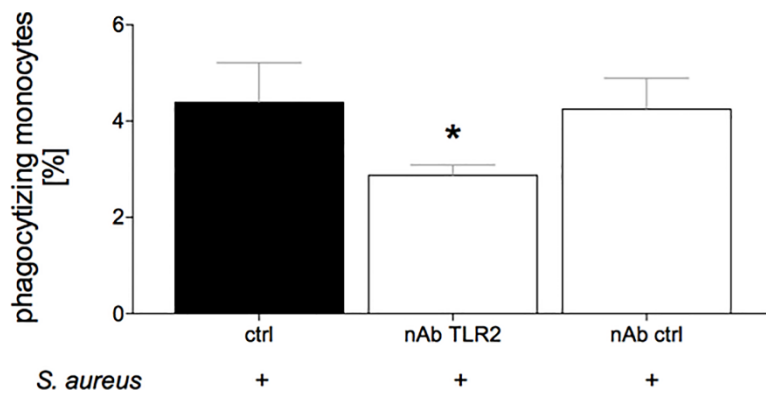


Abb. 4 Bestimmung des prozentualen Anteils der phagozytierenden peripheren Monozyten der Schweine an den gesamten Monozyten in der Kontrollgruppe ohne Antikörper, in der Gruppe mit TLR-2-neutralisierenden Antikörpern und in der Gruppe mit Kontrollantikörpern. Die Vollblutproben wurden mit pHrodo® Red *S. aureus* BioParticles® Conjugate inkubiert. Die Messung erfolgte per Durchflusszytometrie. Die Monozyten wurden durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung unterschieden.

Blutproben wurden gesunden Schweinen (n = 10) entnommen.

Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. *: p < 0,05 gegenüber anderen Gruppen.

7. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Posttraumatisch verminderte Expression von TLR2 ist mit verringerter Phagozytose-Leistung und gestörter Reifung von Monozyten assoziiert“

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn PD Dr. Nils Wagner und mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Ingo Marzi ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Schimunek L, Serve R, Teuben MPJ, Störmann P, Auner B, Woschek M, Pfeifer R, Horst K, Simon TP, Kalbitz M, Sturm R, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. Early decreased TLR2 expression on monocytes is associated with their reduced phagocytic activity and impaired maturation in a porcine polytrauma model. PLoS One 2017 Nov 10;12(11):e0187404

(Ort, Datum)

(Unterschrift)