



**Molekulare Aufklärung der Apoptoseresistenz
in neutrophilen Granulozyten
von Patienten mit schwerem Trauma**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tamara Hornstein
(geb. Kirichevska)

aus Saporoshje, Ukraine

Düsseldorf, Oktober 2013

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. Sascha Flohé, Klinik für Unfall- und Handchirurgie

Korreferent:

Prof. Dr. William Frank Martin, Institut für molekulare Evolution

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2014

*Alles Wissen geht aus einem Zweifel vor
und endigt in einem Glauben.
Marie von Ebner-Eschenbach*

Für Sascha und Amelie

Inhaltsverzeichnis

Die Veröffentlichungen zu dieser Arbeit	iii
Zusammenfassung	iv
Summary.....	vi
1 Einleitung.....	1
1.1 Trauma	1
1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	3
1.2.1 PMN – Mediatoren der Entzündung	5
1.2.2 Die Rolle der PMN im Systemischen Inflammatorischen Reaktions- Syndrom (SIRS) und multiplen Organversagen (MOV)	8
1.3 Apoptosesignalwege in PMN	10
1.3.1 PMN-Apoptose während einer Entzündung oder eines Traumas.....	12
1.4 Rolle der Bcl-2 Familie in der Regulation der PMN-Apoptose	13
1.4.1 Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie	15
1.4.2 Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie	17
1.5 Rolle der Mitochondrien in PMN	18
1.6 Kinasesignalkaskaden in der Regulation der PMN-Apoptose.....	19
2 Fragestellung	21
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Geräte.....	23
3.2 Material	24
3.2.1 Verbrauchsmaterialien	24
3.2.2 Chemikalien und Reagenzien	24
3.2.3 Kits.....	26
3.2.4 Inhibitoren.....	26
3.2.5 Antikörper.....	27
3.2.6 Enzyme	27
3.2.7 Oligonukleotide	28
3.2.8 siRNA	28
3.2.9 Puffer und Lösungen.....	28
3.2.10 Zellen und Zellkulturmedien	31
3.2.11 Software	31
3.3 Methoden	31
3.3.1 Demografie und die Aufnahmekriterien der Patienten in die Studie.....	31
3.3.2 Methoden der Zellkultur	32
3.3.3 Durchflusszytometrische Methoden	36
3.3.4 Molekularbiologische Methoden	38
3.3.5 Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.3.6 Statistische Analyse	49
4 Ergebnisse	51
4.1 In PMN aus Polytrauma-Patienten sind die Mengen von phosphorylierten Kinasen Akt, p38 und GSK-3 erhöht.....	51

4.2	Die Kinasen PI3K/Akt und p38 sind am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt in PMN und in HL-60 Zellen beteiligt.....	52
4.3	Caspasen und Proteasom sind an dem Apoptose-induzierten Abbau von Mcl-1 in PMN beteiligt.....	61
4.4	Das Serum von Polytrauma-Patienten kann die Staurosporin-induzierte Abnahme der phosphorylierten Kinasen Akt und GSK-3 aufheben.....	68
4.5	Ausschaltung der Mcl-1-Proteinexpression erhöht die Sensitivität der PMN aus Polytrauma-Patienten für Staurosporin	71
4.6	Mcl-1 interagiert verstärkt mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie in PMN aus Polytrauma-Patienten	75
4.7	Die verminderte Spaltung und mitochondriale Translokation von Bax und Bid korreliert mit der Hemmung der Freisetzung von Cytochrom <i>c</i> in PMN aus Polytrauma-Patienten	76
5	Diskussion	84
6	Literatur.....	108
7	Anhang	133
	Abkürzungsverzeichnis	133
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	138
	Danksagung.....	141
	Eidesstattliche Erklärung.....	142

Die Veröffentlichungen zu dieser Arbeit

Vorträge:

- Bedeutung antiapoptotischer Faktoren für die Apoptoseresistenz in neutrophilen Granulozyten (PMN) nach schwerem Trauma. 16. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ in Xanten, 25-27.11.2010.
- Rolle des Mcl-1-Proteins in der Apoptose in neutrophilen Granulozyten (PMN) aus Patienten nach schwerem Trauma. 17. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“ in Xanten, 24-26.11.2011.
- Mechanismen der Apoptosedysregulation in neutrophilen Granulozyten (PMN) nach schwerem Trauma. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) in Berlin, 21-25.10.2012.
- Rolle des Mcl-1-Proteins in der Apoptoseregulation in neutrophilen Granulozyten (PMN) nach schwerem Trauma. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) in Berlin, 21-25.10.2013.

Publikationen:

- Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. A. Paunel-Görgülü, T. Kirichevska, T. Lögters, J. Windolf and S. Flohé. Molecular Medicine 18:325-335, 2012.

Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind abundante Zellen des angeborenen Immunsystems und bekämpfen effektiv Pathogene wie Mikroorganismen und Protozoen. PMN sind konstitutiv apoptotisch und charakterisieren sich durch eine extrem kurze Lebensdauer (8 – 20 h). Proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in hohen Konzentrationen nach einem schweren Trauma gebildet werden, bewirken eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne sowie eine Erhöhung der Funktionalität der PMN. Dies kann zu einer massiven Einwanderung prä-aktivierter PMN an Ort des Traumas führen, wodurch häufig sekundäre Gewebe- und Organschädigungen entstehen. Aufgrund einer überschüssigen proinflammatorischen Immunantwort kann sich eine lokale Entzündung zu einer systemischen Entzündungsreaktion (Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom, SIRS) entwickeln, was im frühen multiplen Organversagen (MOV) kulminieren oder die Entwicklung einer Sepsis begünstigen kann.

Die Vorversuche der Arbeit haben belegt, dass sich PMN aus Polytrauma-Patienten durch eine verzögerte konstitutive Apoptose sowie durch eine deutlich ausgeprägte Resistenz gegen den Induktor für intrinsische Apoptose Staurosporin (STS), im Vergleich zu PMN gesunder Probanden, charakterisieren. Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in erhöhten Konzentrationen im Serum polytraumatisierter Patienten nachweisbar sind, können die Expression sowie die Stabilisierung des prädominanten antiapoptotischen Faktors *myeloid-cell leukemia 1* (Mcl-1) in humanen PMN erhöhen. Die Vorinkubation von PMN gesunder Probanden sowie von ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen Zellen der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 mit dem Serum von Polytrauma-Patienten führt zu der Stabilisierung des Mcl-1-Proteins sowie zu einer verzögerten konstitutiven und induzierten intrinsischen Apoptose in diesen Zellen. Die intrinsische Apoptoseresistenz in PMN der Polytrauma-Patienten kann allerdings durch die Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges über den Fas-Rezeptor überwunden werden, was u.a. mit der Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels korreliert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die molekularen Mechanismen untersucht werden, die an der Regulation der Serum-vermittelten erhöhten Mcl-1-Expression sowie verzögerten konstitutiven und induzierten intrinsischen Apoptose in PMN nach einem schweren Trauma beteiligt sind.

In der Arbeit wird gezeigt, dass Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt), Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 in die Regulation der konstitutiven Apoptose sowie in die Vermittlung des Serum-medierten antiapoptotischen Effektes in humanen PMN involviert sind, u.a. durch Modulation der Mcl-1-Proteinexpression. Der Abbau vom Protein Mcl-1 während der konstitutiven und induzierten Apoptose wird sowohl caspase- als auch proteasomabhängig reguliert, und geht mit der Spaltung und der mitochondrialen Translokation von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie Bax und Bid, der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol sowie mit der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) einher.

Die Verzögerung der konstitutiven Apoptose und die intrinsische Apoptoseresistenz in PMN von Polytrauma-Patienten korreliert wiederum mit der Stabilisierung vom Protein Mcl-1, einer erhöhten Heterodimerisierung von Mcl-1 mit proapoptotischen Proteinen Bax, Bid, Bad und Bik, einer verminderten Spaltung und einer verminderten mitochondrialen Translokation von Bax und Bid, der Hemmung des Cytochrom *c*-Austritts sowie der Aufrechterhaltung des MMP. Die spezifische Ausschaltung des Mcl-1-Proteins in Patienten-PMN führte zu einer signifikanten Erhöhung der Sensitivität für den intrinsischen Apoptoseinduktor STS, und konnte somit die intrinsische Apoptoseresistenz in diesen Zellen zum Teil aufheben.

Infolgedessen besagen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Mcl-1 eine essentielle Rolle in der verzögerten konstitutiven Apoptose sowie in der Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz in humanen PMN nach einem schweren Trauma spielt. Zugleich sind in diese Serum-bedingten Prozesse weitere Faktoren, wie die Kinasen PI3K/Akt, GSK-3 und p38, proapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bax und Bid, sowie Proteasen, wie Caspasen und Proteasom, einbezogen. Der Nachweis über die Beteiligung dieser hier identifizierten Faktoren an der Vermittlung des antiapoptotischen Effektes von Patienten-Serum trägt zum besseren Verständnis der Apoptose-regulierenden Mechanismen bei, die eine PMN-Hyperaktivität und unkontrollierte Immunantwort nach einem schweren Trauma auslösen. Außerdem stellen diese Faktoren potentielle Zielmoleküle für die Induktion der Apoptose und/oder Herunterregulation der PMN-Aktivität während einer Entzündungsreaktion, wie z.B. während eines SIRS, dar. Ferner könnte es die Entstehung des frühen MOV und einer Sepsis nach einem schweren Trauma verringern.

Summary

Polymorphonuclear leukocytes (neutrophils or PMN) are the most abundant cells of the innate immune system and represent the first line of defense against invading pathogens such as microorganisms and protozoa. PMN undergo constitutive apoptosis in vivo and therefore possess very short lifespan of 8 – 20 h. After severe injury PMN lifespan and functionality are extended by growth factors and cytokines, existing in high concentrations in the serum of severely injured patients. The prolonged PMN lifespan is due to an impaired intrinsic apoptosis pathway and correlates with the increased expression of antiapoptotic myeloid-cell leukemia 1 (Mcl-1) protein. Delayed apoptosis and massive migration of activated PMN to the inflamed tissue cause long-lasting inflammation and may conduce to the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), followed by early multiple organ failure (MOF). Within the scope of this thesis the molecular mechanisms should be investigated, which are involved in the regulation of serum-mediated delayed constitutive and intrinsic apoptosis and increase in Mcl-1 expression in PMN after severe trauma.

This study demonstrates, that phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 are involved in the regulation of constitutive apoptosis, as well as in antiapoptotic pathways mediated by patient's serum, amongst others by the modulation of the Mcl-1 protein expression. Moreover, it is shown here, that the degradation of Mcl-1 protein during constitutive and induced apoptosis in human PMN is both caspase- and proteasome-dependent, and is associated with the cleavage and mitochondrial translocation of the proapoptotic members of the Bcl-2 family Bax and Bid, the release of cytochrome *c* from the mitochondria into the cytosol, as well as the decrease of mitochondrial membrane potential (MMP).

The delayed constitutive apoptosis and intrinsic apoptosis resistance, seen in PMN from severely injured patients, further correlate with increased heterodimerization of Mcl-1 with the proapoptotic proteins Bax, Bid, Bad and Bik, reduced activation and reduced mitochondrial translocation of Bax and Bid, inhibition of cytochrome *c* release and maintenance of MMP. Mcl-1 knockdown in patient's PMN significantly increased sensitivity to intrinsic apoptosis inductor staurosporine, and therefore could in part overcome intrinsic apoptosis resistance in these cells.

Hence, mcl-1 plays an essential role in the regulation of delayed constitutive apoptosis and intrinsic apoptosis resistance in PMN after severe trauma. The data from this work may help to a better understanding of antiapoptotic regulatory mechanisms, which contribute to PMN hyperactivity and persisting inflammation after severe injury. The identified antiapoptotic factors, such as Mcl-1 and others may represent target molecules to reduce PMN hyperactivation and thus SIRS and MOF.

1 Einleitung

1.1 Trauma

Trauma, meistens mit einer Hämorrhagie einhergehend, gehört zu den häufigsten Todesursachen weltweit, wobei Menschen verschiedener Altersgruppen betroffen sind. Patienten sterben als Folge ihrer schweren Verletzungen oder aufgrund sekundärer Gewebe- und Organschädigungen, die zum multiplen Organversagen (MOV) führen oder die Entstehung einer Sepsis begünstigen können (Hietbrink et al. 2006; Patton et al. 2009; An et al. 2012).

Zusätzliche Organschädigungen und Organversagen nach einem Trauma sind durch ein gestörtes Immunsystem bedingt. Laut dem „*danger model*“ von Matzinger ist eine lokale Entzündungsreaktion des Organismus physiologisch und wird durch sog. „Alarm-Signale“ hervorgerufen (Matzinger 2002). Es entsteht ein positiver Feedback-Regulationsmechanismus, indem bei einer Entzündung oder Trauma von nekrotischen oder lebenden Zellen freigesetzte *damage-associated molecular pattern* (DAMP)-Moleküle die Zellen des Immunsystems stimulieren, Entzündungsmediatoren zu produzieren, wodurch eine weitere Freisetzung von DAMP bewirkt wird (Andersson et al. 2000; Scaffidi et al. 2002; Bianchi 2007). Infolgedessen kommt es zur Aufrechterhaltung und Verstärkung einer lokalen Inflammation, die sich zu einer systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrome* oder Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom, SIRS) entwickeln kann (Hietbrink, Koenderman et al. 2006; Castellheim et al. 2009). Ein SIRS entsteht häufig bei Patienten mit Verbrennungen, Pankreatitis, Ischämie/Reperfusion-Trauma oder Polytrauma (Levy et al. 2003).

Laut einer neuen Definition von 1991 wird Sepsis als SIRS mit einer nachgewiesenen Infektion aufgefasst. Die Schweregrade der Sepsis werden in schwere Sepsis, septischer Schock und multiples Organ-Dysfunktions-Syndrom (MODS) untergliedert (Bone et al. 1992; Bone et al. 2009). Sepsis ist die führende Todesursache von Patienten auf der Intensivstation (*intensive care unit*, ICU) und zählt, mit einer steigenden Inzidenz (Angus et al. 2001), zu den führenden Todesursachen in den USA (Hoyert et al. 2006) und in Deutschland (Brunkhorst 2006). Die Entstehung und die Pathogenese von Sepsis nach einem Trauma ist ein dynamischer, komplexer Prozess, der die zelluläre Aktivierung (wie z.B. von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen), das Auslösen

von neuroendokrinen Mechanismen, die Aktivierung vom Komplement sowie das fibrinolytische System und die Koagulation einbezieht (Vincent et al. 2006).

Etwa 5 % der Patienten entwickeln MOV nach einem schweren Trauma. Bei diesem klinischen Syndrom kommt es zum simultanen oder nacheinander auftretenden Versagen mehrerer Organe, wie Lunge, Leber, Herz oder Nieren (Hietbrink, Koenderman et al. 2006), wodurch die Mortalität auf 50 – 80 % erhöht wird (Bilevicius et al. 2001; Durham et al. 2003). Das frühe MOV kann unmittelbar nach einem schweren Trauma entstehen und wird durch die Mediatoren des hämorrhagisch-traumatischen Schocks, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, hervorgerufen (Malech et al. 1987; Weiss 1989; Waydhas et al. 1992).

Um die Homöostase wiederherzustellen, wird bereits während einer proinflammatorischen Reaktion (z.B. im Rahmen eines SIRS) eine antiinflammatorische Reaktion eingeleitet. Eine überschüssige antiinflammatorische Antwort resultiert mitunter in dem kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktions-Syndrom (*compensatory antiinflammatory response syndrome*, CARS) bzw. in dem komplexen gegenseitigen Reaktions-Syndrom (*mixed antagonist response syndrome*, MARS), die häufig in der Immunparalyse kulminieren (Abb. 1.1).

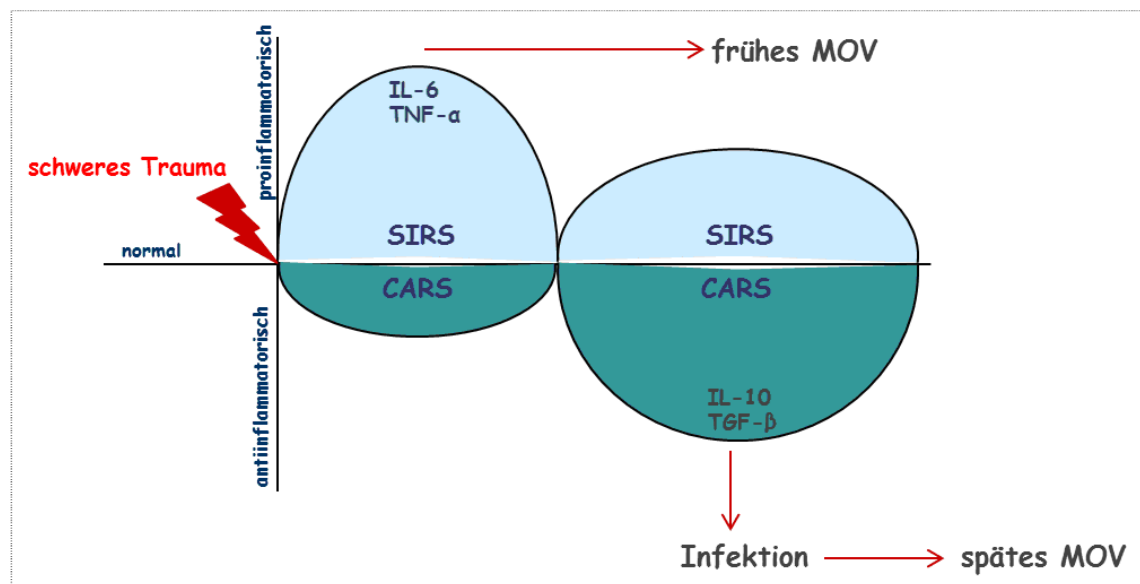


Abbildung 1.1. Das aktuelle Paradigma der Pathogenese des systemischen inflammatorischen Reaktions-Syndroms (SIRS), des kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktions-Syndroms (CARS) und des multiplen Organversagens (MOV) nach einem Trauma.

Trauma und die daraus resultierenden Gewebeverletzungen stimulieren die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor α (*tumor necrosis factor α* , TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6), was die Entstehung eines SIRS bewirkt. Um die Balance zwischen den pro- und antiinflammatorischen Mechanismen wiederherzustellen, wird bereits während einer proinflammatorischen Reaktion die Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren, wie Interleukin 10 (IL-10) oder Transformierender Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor β* , TGF- β), angeregt. Eine überschüssige antiinflammatorische Reaktion führt zur Entstehung eines CARS, das zeitlich parallel zu dem SIRS ablaufen kann. Modifiziert nach Cotran; Sherwood; Ronco *et al.* (Cotran 1999; Sherwood 2002; Ronco et al. 2003).

Zu diesem Zeitraum auftretende Infektionen können zu Komplikationen, wie Sepsis, septischer Schock und spätes MOV, führen (Osuchowski et al. 2006; Kellum et al. 2007; Marik et al. 2012; Novotny et al. 2012). Somit können SIRS und Sepsis, trotz der verschiedenen Pathophysiologie, beide die Entwicklung von MOV bewirken (Hietbrink, Koenderman et al. 2006).

1.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) machen mit ca. 40 – 65 % die größte Zellpopulation von zirkulierenden Leukozyten aus (Edwards 1994). Sie sind die erste Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems und bekämpfen effektiv Pathogene, wie Bakterien, umhüllte Viren, Hefen und Protozoen (Daher et al. 1986; Edwards 1994; Guimaraes-Costa et al. 2009). PMN sind terminal ausdifferenzierte, nicht proliferierende Zellen und werden als extrem kurzlebig angesehen. PMN werden aus den myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet und als reife Zellen ins Blut sezerniert. Dabei verlieren sie Kontakt zu den wichtigsten Faktoren der Granulopoese, wie Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) oder Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), und sterben innerhalb weniger Stunden. Die durchschnittliche Lebensspanne der PMN in der Zirkulation beträgt ca. 8 - 20 h und kann bei einer Entzündung oder Infektion deutlich verlängert werden (Edwards 1994). Laut einer neuen Studie können humane PMN ca. 5,4 Tage in der Zirkulation überleben (Pillay et al. 2010).

Täglich werden ca. $1 - 2 \cdot 10^{11}$ humane PMN gebildet, und die gleiche Anzahl muss eliminiert werden, was für die Modulation der Zellhomöostase unter physiologischen Bedingungen essentiell ist (Squier et al. 1995). Die physiologische Form des PMN-Zelltodes ist die spontane (konstitutive) Apoptose, die durch Zytokine reguliert wird (Savill et al. 1989). Die alternden PMN werden vermutlich durch Kupffer-Zellen in der Leber, durch Makrophagen der roten Pulpa in der Milz und durch Stromamakrophagen im Knochenmark eliminiert (Suratt et al. 2001; Martin et al. 2003; Furze et al. 2008).

Trotz ihrer Kurzlebigkeit weisen PMN erstaunlicherweise ein komplexes Transkriptom auf. Sie exprimieren eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Enzymen sowie zahlreiche Zelloberflächenrezeptoren, die den PMN ermöglichen, auf verschiedene Stimuli zu reagieren. So können PMN durch oberflächliche Integrin-Adhäsionsmoleküle, wie CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$) oder CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$), an aktivierte

vaskuläre Endothelzellen anbinden, um anschließend aus der Zirkulation ins Gewebe zu migrieren (Pettit et al. 1994). Dank *pattern recognition*-Rezeptoren (PRR), wie Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR), wird die Erkennung und Bindung von Pathogenen gewährleistet (Hayashi et al. 2003). Die Bindung von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) an die Fcγ-Rezeptoren induziert PMN-Chemotaxis und Phagozytose sowie Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Fossati et al. 2002).

Essentiell für die Funktion der PMN sind die zytoplasmatischen Granula mit Proteinen, die Pathogene abtöten, aber auch ein gesundes Gewebe zerstören können. Es werden primäre (azurophile) Granula mit Myeloperoxidase, sekundäre (spezifische) Granula mit Lactoferrin, tertiäre Granula mit Gelatinase sowie sekretorische Vesikeln unterschieden (Faurschou et al. 2003) (s. Tab. 1.1).

Tabelle 1.1. Granula und die Inhalte der Granula von PMN.

Granula	Primäre (azurophile) Granula	Sekundäre (spezifische) Granula	Tertiäre (Gelatinase-Granula)	Sekretorische Vesikeln
Inhalte der Granula	Myeloperoxidase Defensine Cathepsin G Elastase Lysozyme Alkalische Phosphatase Hydrolasen Phospholipasen	Lactoferrin Lysozyme Kollagenase Gelatinase Cytochrom b558 CD11b/CD18 fMLP-Rezeptor	Gelatinase Lysozyme Acetyltransferase Cytochrom b558 CD11b/CD18 fMLP-Rezeptor Diaminoxidase H ⁺ -ATPase	Alkalische Phosphatase Cytochrom b558 CD11b/CD18 CD11a/CD18 Komplement-Rezeptor fMLP-Rezeptor

Granula und Vesikeln werden während der Reifung und Differenzierung der PMN im Knochenmark ausgebildet (Borregaard et al. 1995), wobei die Proteine, deren Synthese in reifen PMN stattfindet, nicht verpackt werden (Lapinet et al. 2000). Während der Phagozytose werden Inhalte der Granula in die Phagosomen abgesondert, die durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust werden (Faurschou and Borregaard 2003). Translokation und Exozytose von PMN-Granula ist ein Ca²⁺- und energie-abhängiger Prozess, wobei verschiedene Typen und Subtypen von Granula eine unterschiedliche Sensitivität zu Calcium- und ATP- Gehalt aufweisen (Perez et al. 1987; Nüsse et al. 1998; Theander et al. 2002).

Die Mobilisierung von PMN-Granula unterliegt einer strikten Hierarchie. Die Exozytose von sekretorischen Vesikeln und Gelatinase-Granula, ausgelöst durch Selekt-

tine und Chemokine, wie z.B. Interleukin 8 (IL-8) oder N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), ermöglicht den PMN die Transmigration. Die spezifischen sowie die azurophilen Granula, die höchst potente antimikrobielle und proteolytische Substanzen beinhalten, werden erst am Ort der Entzündung mobilisiert (Kjeldsen et al. 1992; Sengelov et al. 1993; Borregaard et al. 1997). Die Mobilisierung von Vesikeln und Granula bewirkt eine komplette Veränderung des Phänotyps der PMN. Relativ inaktive, in der Zirkulation ruhende PMN erleben eine Umwandlung zu aktiven Zellen. Die aktiven PMN können nun mit den Zellen der Umgebung, wie Endothelzellen, interagieren, so wie auf die Signale vom Entzündungsort reagieren (Faurschou and Borregaard 2003).

1.2.1 PMN – Mediatoren der Entzündung

Das Verständnis der Rolle von PMN in der Entzündung hat sich in den letzten 20 Jahren fundamental geändert. Bekanntermaßen können aktivierte PMN eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen produzieren (Cicco et al. 1990; Dubravec et al. 1990; Lord et al. 1991), MHC-II-Moleküle exprimieren und Antigene den T-Zellen präsentieren (Gosselin et al. 1993; Cross et al. 2003). Außerdem können PMN mit Dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen (*natural killer cells*), Monozyten sowie mit T- und B-Lymphozyten interagieren und somit Reifung und Aktivierung dieser Zellen modulieren (Territo et al. 1989; Mantovani et al. 2011). Demnach sind PMN in der Lage, nahezu alle Funktionen von Makrophagen auszuführen und stellen einen Link zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar.

In der Zirkulation befinden sich PMN in einem ruhenden Zustand, was den Austritt von toxischen Inhalten der Granula und somit eine mögliche Schädigung von gesundem Gewebe verhindert (Hallett et al. 1995). Während einer Entzündung oder Infektion werden zirkulierende PMN in das periphere Gewebe rekrutiert und aktiviert, was in der Degranulation, Phagozytose und dem oxidativen Burst kulminiert (Borregaard and Cowland 1997; Hampton et al. 1998; Faurschou and Borregaard 2003).

Dem aktivierten Status von PMN geht ein wichtiger Schritt voraus: *Priming* oder Prä-aktivierung. Die ruhenden PMN können in der Zirkulation durch Zytokine und Chemokine, wie IL-8, TNF- α , Interferon γ (INF- γ), GM-CSF, oder durch bakterielle Substanzen, wie Lipopolysaccharide (LPS), geprimed werden (McColl et al. 1990; Hallett and Lloyds 1995). *Priming* ist ein reversibler Prozess und stellt somit einen grundlegenden Kontrollpunkt dar, der eine unkontrollierte Aktivierung von PMN verhindert (Cowburn et al. 2008). *Priming* kann durch zwei unabhängige Mechanismen erfolgen. Bei dem rapiden, transkriptionsunabhängigen *Priming* kann innerhalb weniger Minuten

die Anzahl von membranständigen Rezeptoren ohne Proteinsynthese bedeutend erhöht werden. Dies erfolgt durch die Mobilisierung von intrazellulären Granula mit vorgeformten Rezeptoren zu der Plasmamembran. Häufig bewirken jedoch die *Priming*-Agentien die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und können somit die *de novo* Expression von Rezeptoren und Zytokinen induzieren. Dies resultiert in der Verlängerung der Lebensspanne sowie der Erhöhung der Funktionalität der PMN, wie Transmigration und Aktivierung (Hallett and Lloyds 1995).

Die Migration von PMN zum Entzündungsort wird durch die Interaktionen mit vaskulären Endothelzellen kontrolliert. Durch schwachen Kontakt (*loose tethering*) von zelloberflächlichen L-Selektinen sowie dem P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) der PMN mit P- und E-Selektinen der Endothelzellen werden die geprimten PMN in der Zirkulation angehalten und rollen entlang des Endotheliums. Die darauffolgenden Konformationsänderungen der oberflächlichen Integrin-Adhäsionsmoleküle auf PMN und Endothelzellen ermöglichen eine hochaffine Bindung von Liganden und eine starke Adhäsion. Das nachfolgende *rolling arrest* wird durch die Bindung von Chemoattraktanten, wie IL-8, an die entsprechenden PMN-Rezeptoren vermittelt (Ley et al. 2007).

Mithilfe von oberflächlichen Liganden der Endothelzellen und der PMN, wie ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule 2*), PECAM-1 (*platelet endothelial-cell adhesion molecule 1*) und JAM Proteinen (*junctional adhesion molecule*), können PMN durch die interzellulären Räume zwischen den benachbarten Endothelzellen ins Gewebe migrieren (parazelluläre Migration) (Woodfin et al. 2009). Etwa 70 % der migrierenden PMN passieren jedoch die Endothelschicht aktiv (transzelluläre Migration). Die hohe Expression und Dichte von ICAM-1 Adhäsions-Rezeptoren von Endothelzellen sowie die distal agierende endotheliale Guanosintriphosphatase RhoG sind für die transzelluläre PMN-Migration essentiell (Yang et al. 2005; van Buul et al. 2007). Vermutlich nutzen PMN bei der Transmigration bevorzugt die Regionen in der Basalmembran des Endotheliums, die vermindert Matrixproteine, wie Laminin 10 oder Kollagen IV, exprimieren. Diese Bereiche sind ihrerseits mit Lücken zwischen den Perizyten assoziiert (Wang et al. 2006). Lokale Entzündungsmediatoren, wie Histamin, Kinine sowie Metabolite der Arachidonsäure, begünstigen, durch die Erhöhung der Permeabilität von Blutgefäßen, die Infiltration von Immunzellen, bewirken jedoch die Entstehung von Ödemen (Lenz et al. 2007).

Nach dem Verlassen der Zirkulation migrieren PMN, dem chemotaktischen Gradienten folgend, zum Entzündungsort (Servant et al. 2000). Durch die Membranrezeptoren für Komplement-Proteine und IgG findet am Infektionsherd die Erkennung

von opsonisierten Bakterien statt, gefolgt von der Ausbildung von Pseudopodien, Phagozytose und anschließender intrazellulärer Zerstörung von Pathogenen in Phagosomen. Dies erfolgt entweder durch sauerstoffabhängige (Bildung von ROS) (Hampton, Kettle et al. 1998) oder sauerstoffunabhängige Mechanismen, wie z.B. mithilfe von proteolytischen Enzymen, antimikrobiellen Peptiden und durch Azidifizierung von Endosomen mit Mikroorganismen (Faurschou and Borregaard 2003) (Abb. 1.2). Die Hauptquelle von ROS in PMN ist der Enzymkomplex Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, der nach der Bindung von Liganden an die membranständigen *pattern recognition*-Rezeptoren (PRR) oder Zytokin-Rezeptoren aktiviert werden kann (Segal 1989; El Benna et al. 2002; Dewas et al. 2003).

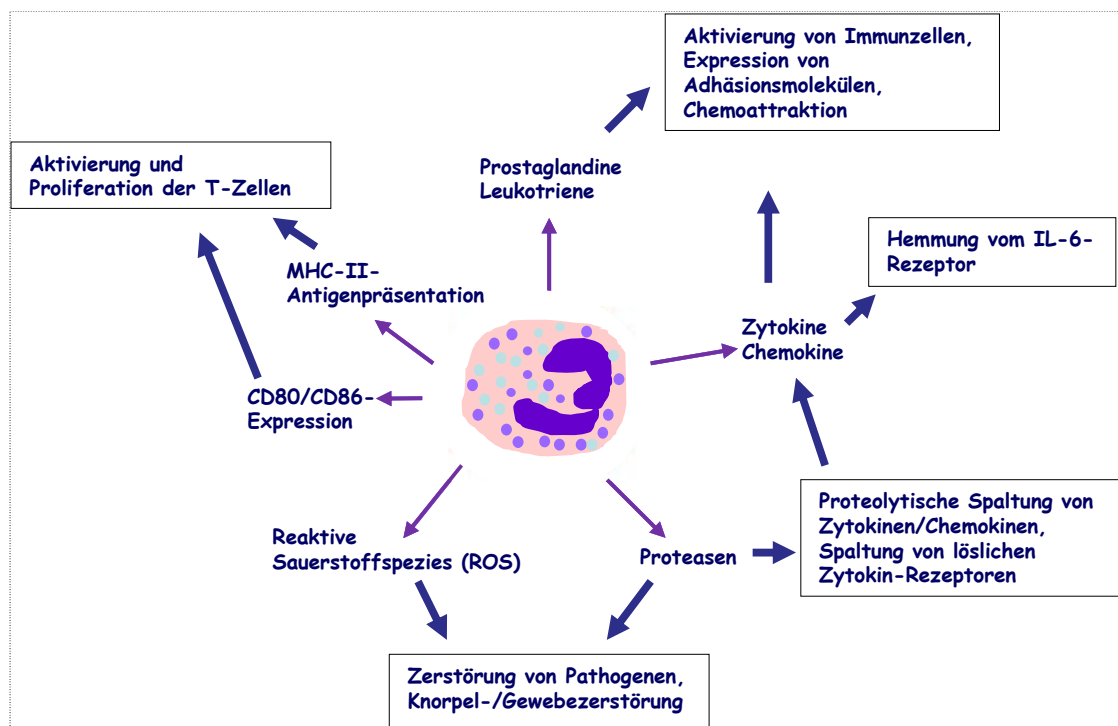


Abbildung 1.2. Funktionen und Produkte der PMN, die die Entzündungsprozesse im Organismus aktiv anregen können.

Am Entzündungsort bekämpfen PMN Pathogene mithilfe antimikrobieller Moleküle (wie Proteasen der PMN-Granula) oder durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die jedoch aufgrund ihrer Unspezifität auch das gesunde Gewebe angreifen können. Proteasen sind außerdem wichtige Mediatoren der Entzündung und sind an der proteolytischen Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen sowie an der Degradierung von löslichen Zytokin-Rezeptoren beteiligt. Die MHC-II-Antigenpräsentation sowie die Expression von kostimulatorischen Molekülen CD80/CD86 induzieren die Aktivierung und die Proliferation von T-Zellen. Die zahlreichen proinflammatorischen Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine (u.a. Leukotrien B₄, Prostaglandin E₂, IL-8 oder IL-1) fördern die Anlockung von PMN sowie von weiteren inflammatorischen Zellen an Ort der Entzündung und wirken auf PMN antiapoptotisch, was die Verlängerung bzw. Verstärkung einer Inflammation bewirken kann. Modifiziert nach Wright *et al.* (Wright et al. 2010).

Am Entzündungsort sterben PMN durch spontane (Savill, Wyllie et al. 1989) oder Todesrezeptor-induzierte Apoptose (Renshaw et al. 2000). Liganden der Todes-Rezeptoren, wie z.B. Fas-Ligand (FasL) oder TNF- α , werden von infiltrierenden Mak-

rophagen freigesetzt (Brown et al. 1999; Renshaw, Timmons et al. 2000). Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z.B. GM-CSF oder IL-17, können in der Endphase der Entzündung eine Umstellung des PMN-Phänotyps vom anti- zum proapoptotischen bewirken (Dragon et al. 2008; Andina et al. 2009; Cowburn et al. 2011). So können Zytokine die *suppressors of cytokine signaling* (SOCS) induzieren, die wiederum Zytokinvermittelte antiapoptotische Wirkung hemmen, was eine rapide Einleitung der PMN-Apoptose hervorruft (Dimitriou et al. 2008). Die Phagozytose von Bakterien am Ort der Infektion aktiviert ebenfalls die Apoptose in PMN. Die apoptotischen PMN werden durch spezifische sog. „eat me“-Signale, wie z.B. durch Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran oder von veränderten Zuckerstrukturen der oberflächlichen Glykoproteine, von inflammatorischen Makrophagen erkannt und folglich beseitigt (Savill 1997). Die Phagozytose von apoptotischen PMN durch Makrophagen induziert wiederum die Ausschüttung von antiinflammatorischen Molekülen, wie IL-10 und TGF- β 1 (Byrne et al. 2002). Im Rahmen dieser Vorgänge werden ansonsten toxische und potente PMN sicher und effizient eliminiert, und somit die optimalen Bedingungen für das Abklingen einer Entzündung im Organismus geschaffen (Cowburn, Condcliffe et al. 2008).

Bei der unzureichenden Phagozytose durch Makrophagen können apoptotische PMN sekundär Nekrose begehen. Dabei zerfallen sie, die zytotoxischen Moleküle der PMN werden in den interzellulären Raum freigesetzt und können das umliegende Gewebe beschädigen. Die Phagozytose von nekrotischen PMN durch Makrophagen bewirkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF, was dagegen zur Anhaltung einer Entzündung führt (Savill et al. 2002).

1.2.2 Die Rolle der PMN im Systemischen Inflammatorischen Reaktions-Syndrom (SIRS) und multiplen Organversagen (MOV)

Ungeachtet ihrer essentiellen Rolle in der angeborenen Immunität zeigen PMN häufig ihr „Janus-Gesicht“ und wirken proinflammatorisch. Es wurde bereits beschrieben, dass PMN zur Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen, wie chronische obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) (Quint et al. 2007; Zhang et al. 2012), rheumatische Arthritis (Edwards et al. 1988; Wipke et al. 2001; Wong et al. 2009), akutes Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) (Windsor et al. 1993) oder zystische Fibrose (Weiss 1989) beitragen. Die Gewebeschädigungen, z.B. nach einem Trauma, bewirken ebenfalls die Prä-aktivierung von PMN und Makrophagen (Hernandez et al. 1987). Der traumabedingte hämorrhagi-

sche Schock und die nachfolgenden Ischämie/Reperfusion begünstigen die Bildung von ROS, die bekanntlich Chemoattraktanten für PMN sind und eine massive Migration und Akkumulation von prä-aktivierten PMN im Gewebe bewirken (Swain et al. 2002).

Am Ort der Entzündung sind PMN den zahlreichen pro- und antiapoptotischen Signalen ausgesetzt, die das Überleben dieser Zellen modulieren (Simon 2003). Die Zytokine und Chemoattraktanten, wie Chemokine und Eikosanoide, die aktivierte PMN und Makrophagen nach einem Trauma produzieren, wirken antiapoptotisch und können zur Verstärkung einer Entzündungsreaktion beitragen (Savill, Dransfield et al. 2002). Andererseits fördern Makrophagen durch die Ausschüttung von löslichem FasL die PMN-Apoptose (Brown and Savill 1999; Renshaw, Timmons et al. 2000) und somit das Abklingen einer Inflammation. Während einer Entzündung zeigen PMN häufig eine gewisse Prädominanz für die antiapoptotischen Signale (Jimenez et al. 1997; Kotone-Miyahara et al. 2004), was in einer unkontrollierten proinflammatorischen Antwort, einer anhaltenden Entzündung und darüber hinaus in einer systemischen Inflammation resultieren kann. Dabei können die zytotoxischen Inhalte der zytoplasmatischen Granula der PMN, wie Proteasen, sowie ROS auch das gesunde Gewebe zerstören, und so die sekundären Gewebe- und Organschädigungen und folglich das frühe MOV bewirken (Botha et al. 1995; Cassatella 1999).

Im peripheren Blut schwerverletzter Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von *Priming*-Agentien der PMN, wie GM-CSF und TNF- α , festgestellt (Dinarello 2000). Außerdem charakterisieren sich PMN aus dem Blut schwerverletzter Patienten durch erhöhte Funktionalität, wie Rolling und Adhäsion (Maekawa et al. 1998; Seidelin et al. 2002), sowie durch eine verlängerte Lebensspanne (Taneja et al. 2004). Die Inzidenz für SIRS und MOV korreliert mit der erhöhten Produktion von ROS durch PMN (Partrick et al. 1996) sowie mit der erhöhten Expression von Transmigrations-Markern der PMN, wie den oberflächlichen L-Selektin und Integrin CD11b/CD18, und erhöhtem Level an löslichem ICAM-1 im Serum schwerverletzter Patienten (Maekawa, Futami et al. 1998). Somit korreliert der aktive Status von PMN mit der Entwicklung von SIRS und MOV, wobei eine hohe Aktivität der PMN mit der Entwicklung eines SIRS und eine weniger aktive Form mit der Entstehung einer Sepsis assoziiert ist (Moore et al. 1996).

Insofern ist es weitgehend anerkannt, dass die sekundären Gewebe- und Organschädigungen und die daraus resultierenden Komplikationen, wie SIRS und frühes MOV, nach einem Trauma in erster Linie auf eine massive Einwanderung prä-

aktivierter PMN an Ort des Traumas sowie erhöhtes zytotoxisches Potential dieser Zellen zurückzuführen sind (Botha, Moore et al. 1995; Yao et al. 1998).

1.3 Apoptosesignalwege in PMN

Der programmierte Zelltod oder Apoptose ist ein fundamentaler und komplexer biologischer Prozess, der der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase während der Entwicklung, unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen dient (Thompson 1995). Die Apoptose kann durch zwei Hauptsignalwege induziert werden: durch extrinsischen oder Todesrezeptor-vermittelten Signalweg und durch intrinsischen mitochondrialen Signalweg (Green 1998). Die Kulmination beider Signalwege ist die Aktivierung von spezifischen Proteasen, den Caspasen (cysteinhaltige Aspartat-spezifische Proteasen). Caspasen degradieren selektiv die zellulären Proteine, was die Spaltung der genomischen DNA und letztendlich den Zelltod nach sich zieht (Nicholson et al. 1997; Cryns et al. 1998).

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird aktiviert, wenn die spezifischen Todesliganden an die membranständigen Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor/Nervenwachstumsfaktor (*tumor necrosis factor/nerve growth factor* TNF/NGF)-Rezeptor Superfamilie binden (Ashkenazi et al. 1998). PMN exprimieren eine Vielzahl von Todesrezeptoren, u.a. Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) (Murray et al. 1997), TRAIL-Rezeptor (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Renshaw et al. 2003), CD95-Rezeptor (Apo-1 oder Fas-Rezeptor, FasR) sowie Fas-Ligand (FasL) (Liles et al. 1996). Die Bindung z.B. von FasL an FasR resultiert in der Trimerisierung des Rezeptors sowie in der Ausbildung des DISC (*death-inducing signaling complex*), bestehend aus dem Todesrezeptor, dem Adaptor-Protein FADD (*Fas-associated death domain*) und der Initiator Procaspase-8 (Green 1998). Im Zuge der Autoprozessierung der Procaspase-8 entsteht eine aktive Caspase-8, die distale Effektorcaspasen, wie z.B. die Caspase-3, aktiviert (Muzio et al. 1998).

Entstehen die Todessignale innerhalb der Zelle, z.B. durch DNA-Schädigung oder aufgrund missgefalteter Proteine, wird der intrinsische mitochondriale Signalweg aktiviert. Die Aktivierung von Effektorcaspasen wird durch die Ausbildung des Apoptosomen hervorgerufen. Diesem Vorgang geht die Depolarisierung der Mitochondrien voraus, einem Merkmal der frühen Apoptose (Shimizu et al. 1996). Die Depolarisierung der Mitochondrien wird von Proteinen der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) Familie reguliert, und ist durch den Austritt des proapoptotischen Proteins Cytochrom *c*

aus den Mitochondrien ins Zytosol bedingt (Kluck et al. 1997). Im Zytosol assoziiert Cytochrom *c* mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) und der Initiator Procaspase-9 und bildet das Apoptosom aus. Im Apoptosom aktivierte Caspase-9 aktiviert ihrerseits die Effektorcaspase-3 (Li et al. 1997) (Abb. 1.3).

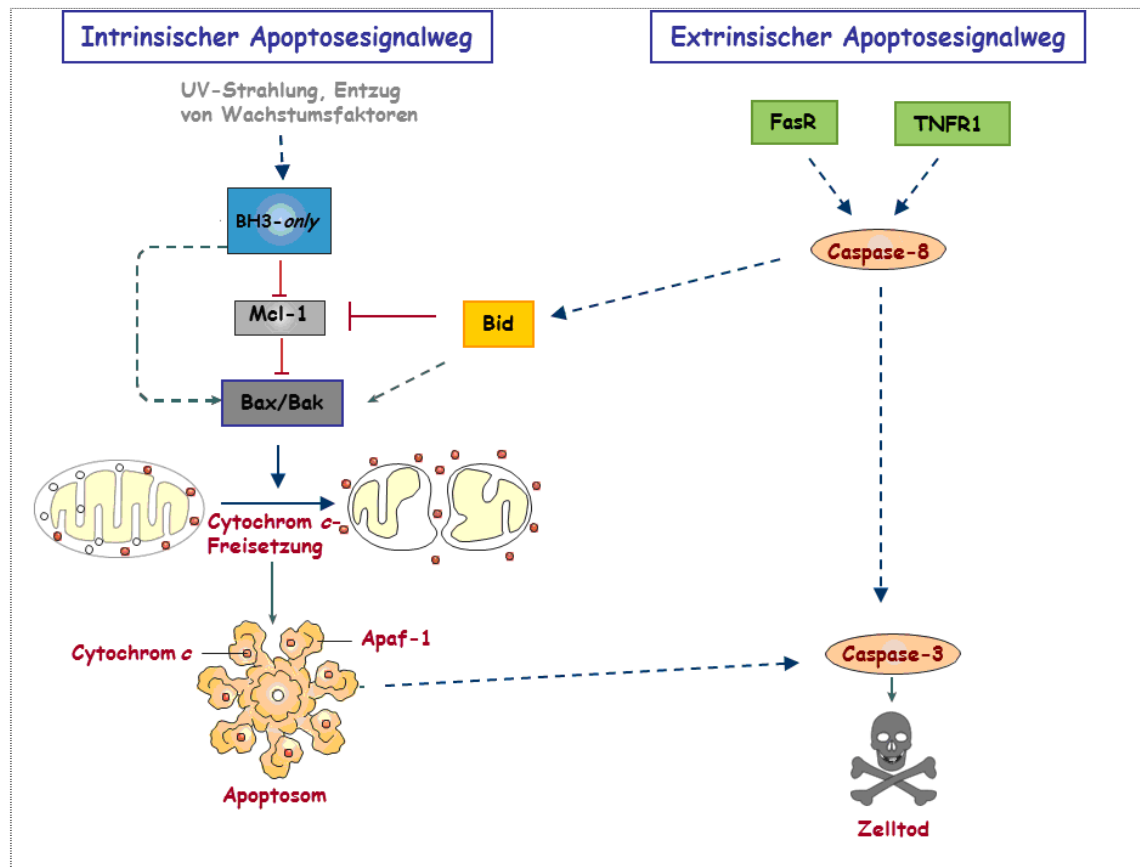


Abbildung 1.3. Die schematische Darstellung des intrinsischen und des extrinsischen apoptotischen Signalwege.

In humanen PMN kann die extrinsische Apoptose durch die Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. Fas-Rezeptor (FasR) oder Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1), induziert werden, wogegen die intrinsische Apoptose durch zahlreiche genotoxische Agentien oder Stoffwechselstörungen aktiviert werden kann. Die intrinsische Apoptose beinhaltet die Aktivierung von BH3-only Proteinen, die die antiapoptotischen Faktoren, wie z.B. *myeloid-cell leukemia 1* (Mcl-1), inaktivieren können. Dies bewirkt die Befreiung und mitochondriale Translokation von proapoptotischen Proteinen Bax und/oder Bak, was in dem Austritt von Cytochrom *c* (Cyt *c*) aus den Mitochondrien ins Zytosol, der Ausbildung von Apoptosomen, der Aktivierung von Initiatorcaspase-9 und der nachfolgenden Aktivierung von Effektorcaspase-3 resultiert. Die Caspasen aktivieren ihrerseits die DNasen und kontrollieren die Zellzerstörung. Die extrinsische Apoptose verläuft in humanen PMN ebenfalls über Mitochondrien. Das proapoptotische Protein Bid stellt hier einen Link zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Apoptosesignalwegen dar. Bid wird durch Caspase-8 gespalten und aktiviert, und kann nachfolgend die proapoptotischen Bax und/oder Bak aktivieren, oder wird selbst zu den Mitochondrien transloziert. Modifiziert nach Youle *et al.* (Youle et al. 2008).

In zahlreichen Zelltypen, zu denen auch PMN zählen, sind Mitochondrien auch in den extrinsischen Apoptosesignalweg einbezogen. Hierbei dienen Mitochondrien der Verstärkung des Signals und bewirken die Aktivierung von Caspase-3 (Scaffidi et al. 1998). Das Mitglied der Bcl-2 Familie und der spezifische *Target* der Caspase-8, das proapoptotische Protein Bid, stellt einen Link zwischen dem Komplex DISC und den

Mitochondrien dar. Aktiviertes Bid transloziert zu den Mitochondrien und kann den Austritt von Cytochrom *c* bewirken (Barnhart et al. 2003).

Die spontane PMN-Apoptose wird vermutlich in erster Linie durch den intrinsischen mitochondrialen Signalweg reguliert, wobei der Entzug von Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF, und die Konzentrationsabnahme vom antiapoptotischen Protein Mcl-1 eine entscheidende Rolle spielen (Moulding et al. 2001). Nicht ausgeschlossen ist die Rolle des extrinsischen Apoptosesignalweges in der spontanen Apoptose. So schlagen Scheel-Toellner *et al.* ein mögliches Modell für die spontane PMN-Apoptose vor, bei dem es aufgrund des *Clustering* von Todesrezeptoren zu nachfolgender Verstärkung des Signals zu den Mitochondrien, Aktivierung der Caspase-3 und dem Zelltod kommt (Scheel-Toellner et al. 2004).

1.3.1 PMN-Apoptose während einer Entzündung oder eines Traumas

Ein erhöhtes, zerstörerisches Potential von aktivierten PMN bei einer Entzündung oder einem Trauma ist meistens mit einer verlängerten Lebensspanne und somit mit einer gestörten Apoptose in diesen Zellen verbunden (Ogura et al. 1999; Hotta et al. 2001; Raza et al. 2006). So tritt eine Verzögerung der PMN-Apoptose unmittelbar nach einem Trauma ein und kann bis zu 3 Wochen anhalten (Taneja, Parodo et al. 2004).

Ein breites Spektrum von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine GM-CSF (Brach et al. 1992), G-CSF und INF- γ (Colotta et al. 1992), IL-1 β und TNF- α (Martin 1999; van Griensven et al. 1999), bakterielle Komponenten, wie LPS (Lee et al. 1993), aber auch Adenosintriphosphat (ATP) (Gasmi et al. 1996), Leukotrien B₄ (Lee et al. 1999) und Prostaglandin E₂ (Ottonello et al. 1998), bewirken eine Senkung der PMN-Apoptose und somit die Neutrophilie, was primär zur Optimierung der Funktionalität von PMN beitragen soll. Bei zahlreichen Erkrankungen wurde eine Korrelation zwischen erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Serum und der gestörten PMN-Apoptose dokumentiert. So wurde eine erhöhte Produktion von Chemokinen bei zystischer Fibrose, rheumatischer Arthritis und Sepsis beobachtet (Scapini et al. 2000). Eine verzögerte Apoptose wurde in PMN aus Patienten u. a. mit SIRS und Sepsis (Jimenez, Watson et al. 1997; Keel et al. 1997; Ogura et al. 1999), zystischer Fibrose (Dibbert et al. 1999) und ARDS beschrieben (Matute-Bello et al. 1997).

Andererseits wird über eine erhöhte Apoptose von PMN, die zu der Neutropenie führt, nach Chemotherapie (Crawford 2004), Knochenmarktransplantation (Minchinton

et al. 1985), bei Felty-Syndrom und neutropenischem systemischem Lupus erythematosus berichtet (Hellmich et al. 2002).

Somit sind der programmierte Zelltod und eine korrekte Regulation der Apoptose grundlegend, um die Zellhomöostase der PMN unter physiologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten, aber auch, um eine effiziente Beseitigung von Pathogenen und das Abklingen einer Entzündung zu gewährleisten (Squier, Sehnert et al. 1995; Akgul et al. 2001).

1.4 Rolle der Bcl-2 Familie in der Regulation der PMN-Apoptose

In der Regulation beider Apoptosesignalwege in PMN spielt die Familie der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) Proteine eine essentielle Rolle. Die Bcl-2 Familie repräsentiert die neue Klasse von Onkogenen, die durch Hemmung der Apoptose die Onkogenese fördert (Vaux et al. 1988). Alle Mitglieder dieser Familie weisen mindestens eins von vier relativ konservierten Bcl-2 Homologie (BH)-Domänen auf und werden in anti- und proapoptotische Faktoren unterteilt (Youle and Strasser 2008) (Abb. 1.4).

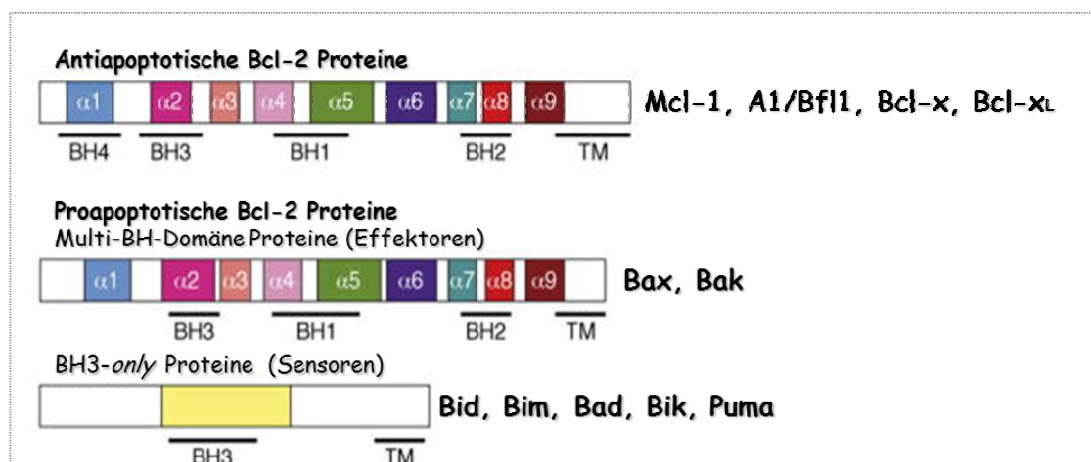


Abbildung 1.4. Die Proteine der Bcl-2 Familie werden aufgrund der Zusammensetzung der relativen Bcl-2 Homologie (BH)-Domänen in drei funktionelle Gruppen unterteilt.

Zu den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, die alle vier BH-Domänen besitzen, zählen in humanen PMN A1/Bfl1, Bcl-x und Bcl-x_L. Das antiapoptotische Protein Mcl-1 stellt eine Ausnahme dar und besitzt BH1-3 Domänen. Die proapoptotischen multi-BH-Domäne Proteine, Bax und Bak, besitzen, ebenfalls wie Mcl-1, BH1-3 Domänen und agieren als Effektoren der Apoptose. Die BH3-only Proteine, wie Bid, Bad, Bim, Bik und Puma, haben nur eine konservierte BH3-Region und fungieren als Sensoren des apoptotischen zellulären Stresses. Modifiziert nach Chipuk *et al.* (Chipuk et al. 2008).

Humane PMN exprimieren konstitutiv antiapoptotische Mitglieder, wie Mcl-1 (*myeloid-cell leukemia 1*) (Leuenroth et al. 2000), A1/Bfl1 (Chuang et al. 1998), Bcl-x (*B-cell lymphoma*) (Weinmann et al. 1999) und Bcl-x_L (*B-cell lymphoma-extra large*) (Cowburn et al. 2002). Van Der Vliet *et al.* beschreiben außerdem die Expression von

antiapoptotischem Bcl-2 in reifen PMN (Van Der Vliet et al. 1997), obwohl die meisten Arbeitsgruppen diesen Faktor weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachweisen konnten (Hannah et al. 1995; Weinmann, Gaehtgens et al. 1999).

Die proapoptotischen Faktoren werden ihrerseits in multi-BH-Domäne (Bax und Bak) und BH3-*only* (Bid, Bad, Bik, Bim und Puma) Proteine unterteilt (Moulding, Akgul et al. 2001; Saldanha-Gama et al. 2010; Cowburn, Summers et al. 2011). Die BH3-*only* Proteine sind Sensoren des zellulären Stresses (Giam et al. 2008; Lomonosova et al. 2008), während die multi-BH-Domäne Proteine die essentiellen Effektoren der Apoptose sind. Sie agieren distal von antiapoptotischen und BH3-*only* Faktoren und können die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) und die nachfolgende Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom *c* und Smac/DIABLO, bewirken (Wei et al. 2001; Chipuk et al. 2006).

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie entfalten ihre Wirkung indem sie direkt an die proapoptotischen Proteine binden und somit diese in ihrer Funktion hemmen und die MOMP verhindern (Yin et al. 1994; Cheng et al. 2001). Damit reguliert das Zusammenspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren einen der frühen Schritte der Apoptose, die MOMP (Chipuk and Green 2008). Die Überexpression von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie bewirkt die Hemmung sämtlicher apoptotischer Vorgänge an Mitochondrien (Shimizu, Eguchi et al. 1996). Insofern können sich die Proteine der Bcl-2 Familie gegenseitig regulieren (Abb. 1.5), so dass eine Balance in der Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren für das Zellüberleben und den Zelltod entscheidend ist.

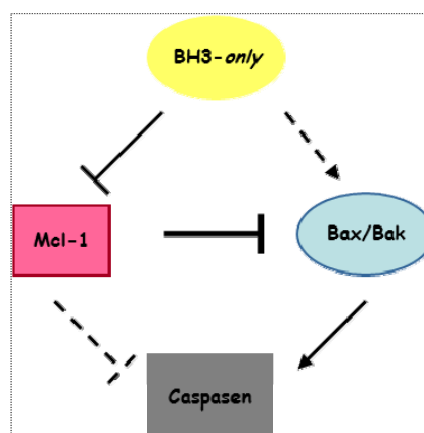


Abbildung 1.5. Die drei wichtigsten Fraktionen der Bcl-2 Familie in humanen PMN.

Die BH3-*only* Proteine sind die essentiellen Initiatoren der Apoptose und können direkt die antiapoptotischen Proteine, wie Mcl-1, hemmen. Proteine Bax/Bak agieren ihrerseits distal von Mcl-1 und bewirken indirekt die Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen. Mcl-1 kann, vermutlich durch die Hemmung von Bax/Bak, die MOMP und die nachfolgende Aktivierung von Caspasen inhibieren. Modifiziert nach Adams (Adams 2003).

1.4.1 Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie

Die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie Mcl-1 (Kozopas et al. 1993), A1 (Lin et al. 1993) sowie sein humanes Homolog Bfl1 (Choi et al. 1995) wurden ursprünglich als *immediate-early response genes* identifiziert. Die Expressionslevel, zelluläre Lokalisierung, Stabilität sowie die Fähigkeit von Mcl-1 und A1/Bfl1 mit proapoptotischen Proteinen Dimere auszubilden sind essentiell für die Regulation der PMN-Apoptose (Edwards et al. 2004).

Humane PMN exprimieren Mcl-1 und A1/Bfl1 konstitutiv, wobei die Expression durch proinflammatorische Zytokine, wie GM-CSF, und bakterielle Komponenten, wie LPS, gesteigert werden kann (Chuang, Yee et al. 1998; Moulding, Akgul et al. 2001). Die Inhibitoren der Proteinsynthese, wie Cycloheximid oder das Pilzmetabolit Gliotoxin, sind bekannte Induktoren der PMN-Apoptose (Waring 1990; Yang et al. 1996; Ward et al. 1999) und bestätigen die Annahme, dass PMN zum Überleben auf die konstitutive Expression der antiapoptotischen Faktoren angewiesen sind. Ein hoher Mcl-1- (Edwards, Derouet et al. 2004) bzw. A1/Bfl1-Level (Chuang, Yee et al. 1998) korreliert mit der Verzögerung der Apoptose und dem Überleben der PMN. Dagegen korreliert der Abbau des Mcl-1-Proteins mit der Induktion der PMN-Apoptose (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000).

Mit seiner Größe von 40 - 42 kDa ist Mcl-1 ein untypisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Das Protein besitzt putative Domänen BH1-3 und kann daher mit anderen Proteinen der Bcl-2 Familie, die eine BH4-Domäne besitzen, interagieren. Am N-Terminus weist Mcl-1 PEST-Sequenzen (Prolin, Glutamat, Serin und Threonin) auf, die das Protein zur Polyubiquitylierung und zu dem Abbau in Proteasomen leiten (Kozopas, Yang et al. 1993). Die Mcl-1-mRNA sowie das Protein haben eine kurze Lebensdauer (ca. 2 - 3 h) und werden durch eine Balance zwischen *de novo* Synthese und Abbau reguliert (Moulding, Akgul et al. 2001). Für die Funktion des Mcl-1-Proteins ist seine Assoziation mit den Zellorganellen wichtig. Mcl-1 kann an der äußeren mitochondrialen Membran, aber auch an der Zellkernmembran oder im Zytosol lokalisiert sein (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000). Im Zytosol ist Mcl-1 vermutlich mit den sekretorischen Vesikeln und azurophilen Granula assoziiert (Gardai et al. 2004).

Die Expression von Mcl-1, als ein wichtiger antiapoptotischer Faktor, wird in PMN strikt auf unterschiedlichen Ebenen reguliert: transkriptional durch verschiedene Kinasen, wie z.B. MEK/ERK, MAPK p38, PI3K/Akt und JAK/STAT 3/5 (Craig 2002); posttranskriptional durch alternatives *Splicing*, z.B. von Exonen 1 und 3 und Ausbil-

dung vom proapoptotischen BH3-*only* Mcl-1_S Protein (Bae et al. 2000; Bingle et al. 2000); sowie posttranslational infolge des Abbaus durch Proteasen, wie Proteasomen (Derouet et al. 2004), Caspasen oder Granzym B (Clohessy et al. 2004; Michels et al. 2004). Die Phosphorylierung an bestimmten Aminosäure-Resten ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen, die die Stabilität und somit die Halbwertszeit des Mcl-1-Proteins beeinflusst. So verringert die Phosphorylierung von Mcl-1 am Threonin 163 durch ERK den Abbau und erhöht somit die Stabilität dieses Proteins, was auf die Zelle antiapoptotisch wirkt (Domina et al. 2000). Dagegen führt die Phosphorylierung am Serin 121 und Threonin 163 durch JNK (Inoshita et al. 2002) oder am Serin 159 durch Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) (Maurer et al. 2006) zu der Inaktivierung von Mcl-1 sowie zu der Erhöhung der PMN-Apoptose. Nachfolgend kann es zur Polyubiquitinylierung von Mcl-1 durch Mcl-1 Ubiquitinylierungs-Ligase E3 (MULE) und zu dem Abbau in den Proteasomen kommen (Derouet, Thomas et al. 2004; Zhong et al. 2005).

Das A1/Bfl1 Protein besitzt 4 konservierte BH-Domänen (Choi, Park et al. 1995) und befindet sich vermutlich nur im Zytosol. A1/Bfl1 ist, ebenso wie Mcl-1, ein instabiles Protein und hat eine extrem kurze Halbwertszeit von 15 min, die ohne C-Terminus auf ca. 1 h ansteigt. Ähnlich wie bei Mcl-1, wird die Stabilität des A1/Bfl1-Proteins und seine antiapoptotische Funktion durch Phosphorylierung und nachfolgende Polyubiquitinylierung und Degradierung in Proteasomen reguliert (Herold et al. 2006).

Es ist beschrieben, dass in humanen PMN Mcl-1, Bcl-x_L und A1/Bfl1 mit dem proapoptotischen Protein Bax Heterodimere ausbilden können (Epling-Burnette et al. 2001; Gardai, Hildeman et al. 2004). Aufgrund der Interaktionen zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen wird vermutlich nicht nur die Neutralisierung der proapoptotischen Faktoren, sondern auch die Stabilisierung der antiapoptotischen Proteine, durch Hemmung der Polyubiquitinylierung und des Abbaus, erreicht (Herold, Zeitz et al. 2006; Wuilleme-Toumi et al. 2007).

Aufgrund der antiapoptotischen Funktion und der induzierbaren Expression von Mcl-1 und A1/Bfl1 besitzen diese Faktoren ein onkogenes Potential und sind vermutlich an der Entstehung bestimmter Tumoren beteiligt. So wurde die erhöhte Mcl-1- (Zhou et al. 2001; Ding et al. 2007) und A1/Bfl1-Expression (Choi, Park et al. 1995; Mandal et al. 2005) in zahlreichen Tumoren des Menschen und der Maus dokumentiert. Dies macht Mcl-1 und A1/Bfl1 zu potentiellen Zielmolekülen bei Krebstherapien (Thallinger et al. 2004; Henson et al. 2006). Andererseits erlaubt die Mcl-1- und A1/Bfl1-medierte Verzögerung der Apoptose den PMN das Überleben für längere Perioden sowie das

Ausführen der Abwehrreaktion. Die kurze Lebensdauer dieser Faktoren ist wiederum für das Abklingen einer Entzündung essentiell (Edwards, Derouet et al. 2004), wobei diese Proteine vermutlich unterschiedliche Wirkmechanismen haben (Akgul, Moulding et al. 2001).

1.4.2 Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie

In humanen PMN sind Bax, Bid und Bad die wichtigsten proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie. Im Vergleich zu den antiapoptotischen Mcl-1 und A1/Bfl1, charakterisieren sich die proapoptotischen Proteine durch eine erhöhte Stabilität und eine lange Halbwertszeit (Moulding, Akgul et al. 2001). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Expression von proapoptotischen Faktoren nicht Zytokin-induzierbar ist. Neuere Studien besagen jedoch, dass die Expression von mehreren proapoptotischen Faktoren in humanen PMN, u.a. von Bid (Moulding, Akgul et al. 2001), Bax, Bad und Bim (Cowburn, Cadwallader et al. 2002; Cowburn, Summers et al. 2011) durch Zytokine moduliert werden kann.

Multi-BH-Domäne Proteine wie Bax und Bak sind für die frühe Phase der Apoptose, die MOMP, essentiell (Wei, Zong et al. 2001). Das Protein Bak ist mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert, wogegen Bax durch eine diffuse zytosolische Lokalisation charakterisiert ist (Wolter et al. 1997; Cheng et al. 2003). Nach apoptotischen Stimuli kann Bax, vermutlich durch die Ca^{2+} -abhängige Cysteinprotease Calpain-1, zu einer kürzeren Form (*truncated* Bax, tBax) gespalten und somit aktiviert werden (van Raam et al. 2008). Dadurch wird dem Bax ein höheres proapoptotisches Potential sowie eine höhere Affinität für die mitochondriale Translokation verliehen, und ferner die Interaktion mit antiapoptotischen Faktoren verhindert (Gao et al. 2000; Tang et al. 2000; Simon 2003; Altnauer et al. 2004). Bax kann vermutlich direkt Poren in der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden und die Freisetzung proapoptotischer Faktoren bewirken. Diesem Schritt geht die Oligomerisierung dieses Proteins voraus (Desagher et al. 1999; Eskes et al. 2000; Kuwana et al. 2002). Die mitochondriale Lokalisation von Bax wird mittlerweile als ein sensibles und verlässliches Merkmal der Apoptose in humanen PMN anerkannt (Maiani et al. 2004).

BH3-only Proteine sind entweder im Zytosol (Zha et al. 2000; Cowburn, Summers et al. 2011) oder an den Mitochondrien lokalisiert (Cowburn, Cadwallader et al. 2002; Gomez-Bougie et al. 2005). Der genaue Wirkmechanismus dieser Faktoren ist noch nicht gründlich erforscht worden. Vermutlich agieren BH3-only Proteine als Inhibitoren von antiapoptotischen Faktoren und/oder als Effektoren oder Aktivatoren von

proapoptotischen multi-BH-Domäne Proteinen. Laut der „*death by default*“ Hypothese fördern BH3-*only* Proteine Apoptose, indem sie die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie neutralisieren und Bax und Bak aus den Komplexen befreien (Cheng, Wei et al. 2001). Nach der „*hit and run*“ Theorie können Bax und Bak direkt von bestimmten BH3-*only* Proteinen aktiviert werden, wobei die Hemmung von antiapoptotischen Proteinen für die Einleitung der Apoptose vermutlich notwendig bleibt (die „*life by default*“ Hypothese) (Letai et al. 2002).

Für das BH3-*only* Mitglied Bid ist die Spaltung durch Caspase-8 und Caspase-3 zu einer kürzeren aktiven Form (*truncated* Bid, tBid) beschrieben (Slee et al. 2000; Desagher et al. 2001; Degli Esposti et al. 2003). Bid kann direkt Bax aktivieren, indem Bid die Oligomerisierung und Einfügung in die äußere mitochondriale Membran von Bax induziert. Vermutlich kann Bid, ebenfalls wie Bax, zu den Mitochondrien transloziert werden und direkt Poren in der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden (Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Eskes, Desagher et al. 2000; Grinberg et al. 2002).

1.5 Rolle der Mitochondrien in PMN

Laut neuesten Erkenntnissen besitzen humane PMN nur wenige Mitochondrien, deren Funktion nahezu auf die Regulation der Apoptose reduziert ist (Murphy et al. 2003; Maiani et al. 2004). So sind die Mitochondrien nicht am oxidativen Burst und der Phagozytose beteiligt. Die Hemmung der mitochondrialen Funktion bewirkt keine Erhöhung der PMN-Apoptose, obwohl die Translokation vom proapoptotischen Protein Bax zu den Mitochondrien (Maiani, Roos et al. 2004), die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) (Fossati et al. 2003) sowie die Degradierung (*Clustering*) der Mitochondrien als Merkmale der frühen Apoptose in humanen PMN gelten.

Es wird angenommen, dass der Energiebedarf der PMN zum größten Teil durch die Glykolyse und nicht durch die oxidative Phosphorylierung gedeckt wird (Karnovsky 1968; Borregaard et al. 1982; van Raam, Sluiter et al. 2008). Murphy *et al.* beschreiben, dass humane PMN einen extrem niedrigen Expressionslevel vom wichtigen Enzym der Atmungskette, dem Cytochrom *c*, aufweisen, was durch eine hohe Expression von Apaf-1 kompensiert wird (Murphy, O'Neill et al. 2003).

Indessen besitzen humane PMN ein hochentwickeltes mitochondriales System, das für wichtige zelluläre Prozesse, wie Chemotaxis oder Aufrechterhaltung der Zellform, notwendig ist (Fossati, Moulding et al. 2003). Die restliche Expression von den Enzymen der Atmungskette ist dennoch ausreichend, um das transmembrane mitochondriale

Potential aufrechtzuerhalten (van Raam, Sluiter et al. 2008). Mitochondrien der PMN enthalten außer Cytochrom *c* weitere proapoptotische Faktoren, wie Smac/DIABLO, HtrA2/Omi und AIF (*apoptosis-inducing factor*). Smac/DIABLO und HtrA2/Omi werden während der Apoptose ins Zytosol freigesetzt und begünstigen, durch die Inaktivierung von IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), die Aktivierung von Caspase-9 (Murphy, O'Neill et al. 2003; Altnauer, Conus et al. 2004; Maiani, Geissler et al. 2004).

Außerdem können PMN Kern- sowie mitochondriale DNA mit Histonen und Granula-Proteinen als extrazelluläre Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NETs) gegen Bakterien, Hefen und Protozoen aus der Zelle ausschleudern (Guimaraes-Costa, Nascimento et al. 2009; Yousefi et al. 2009). Somit erfüllen PMN, im wahrsten Sinne die „Kamikaze-Zellen“ des Immunsystems, die antimikrobielle Funktion sogar nach ihrem Tod.

1.6 Kinasesignalkaskaden in der Regulation der PMN-Apoptose

Die Entzündungssignale werden in erster Linie durch Proteinkinasen und Phosphatasen in die Zelle geleitet und lösen somit die Aktivierung von bestimmten Signalkaskaden aus. Dies resultiert in der rapiden posttranskriptionalen oder posttranslationalen Modulation einer Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren und/oder in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Akgul, Moulding et al. 2001; Namas et al. 2012).

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Tyrosinkinasen, wie z.B. Lyn, für die Transduktion von extrazellulären Signalen in humanen PMN wichtig sind (Wei et al. 1996). Die Aktivierung von Tyrosinkinasen löst ihrerseits die Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt)- (Cantley 2002) sowie von Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)- (Chang et al. 2001) Signalwegen aus. Die MAPK-Signalwege (ERK, JNK und p38), aber auch der PI3K/Akt-Signalweg sind bekanntlich an der Regulation der PMN-Apoptose, durch Modulation der Expression von Mitgliedern der Bcl-2 Familie, beteiligt (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001; Arruda et al. 2004; Nakamae-Akahori et al. 2006). Die Zytokin-vermittelte Aktivierung von MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegen resultiert in der Verzögerung der Apoptose von PMN (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001; Klein 2002; Derouet, Thomas et al. 2004), während die Hemmung von PI3K/Akt die PMN-Apoptose erhöht (Luo et al. 2008). Die PI3K/Akt- und ERK-Signalwege sind direkt an der GM-CSF-vermittelten Stabilisierung vom antiapoptotischen Protein Mcl-1 und Hemmung des proapoptotischen Proteins Bax

beteiligt (Derouet, Thomas et al. 2004; Gardai, Hildeman et al. 2004). Die Kinase JNK bewirkt dagegen die Neutralisierung des Mcl-1-Proteins, was mit der Erhöhung der PMN-Apoptose korreliert (Inoshita, Takeda et al. 2002).

Der PI3K/Akt-vermittelte Effekt auf Mcl-1 wird durch die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) ausgeübt. Die wachstumsfaktorenabhängige Aktivierung von PI3K/Akt bewirkt die Phosphorylierung und Inhibierung von GSK-3 (Cross et al. 1995). Dies resultiert in der Stabilisierung von Mcl-1 und der Verzögerung der PMN-Apoptose (Zhao et al. 2007). Beim Entzug von Wachstumsfaktoren verbleibt GSK-3 in humanen PMN aktiv und kann Mcl-1 direkt am Serin 159 phosphorylieren und inaktivieren. Dies führt zu der Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels aufgrund der Polyubiquitinylierung und Degradierung in Proteasomen (Maurer, Charvet et al. 2006; Ding, He et al. 2007).

Die Rolle der MAP Kinase p38 in der PMN-Apoptose bleibt unklar. Aus einigen Studien geht hervor, dass p38 direkt die Caspase-8 und Caspase-3 phosphorylieren und inhibieren kann, und somit antiapoptotisch wirkt. Die Hemmung dieses Signalweges erhöht die spontane PMN-Apoptose (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000; Alvarado-Kristensson et al. 2002; Harter et al. 2002). Andere Autoren postulieren dagegen eine proapoptotische Wirkung von p38 in humanen PMN (Frasch et al. 1998; Aoshiba et al. 1999; Derouet et al. 2006; Geering et al. 2011).

2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen untersucht werden, die an der Regulation konstitutiver Apoptose in PMN unter physiologischen Bedingungen sowie an der Serum-vermittelten Verzögerung der Apoptose in PMN nach einem schweren Trauma beteiligt sind.

Es wurden folgende Punkte untersucht:

1. Charakterisierung der PI3K/Akt- und MAPK-Signalwege in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten
2. Charakterisierung des Abbaus des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 nach Aktivierung des intrinsischen sowie des extrinsischen Apoptosesignalwege in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten
3. Spezifische Ausschaltung der Mcl-1-Proteinexpression und nachfolgende Untersuchung der Relevanz dieses Proteins für die Apoptoseresistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten
4. Untersuchung einer möglichen Interaktion des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 mit den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten
5. Charakterisierung der subzellulären Lokalisation der proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie Bax und Bid sowie Untersuchung einer möglichen Translokation dieser Proteine zu den Mitochondrien nach Aktivierung des intrinsischen sowie des extrinsischen Apoptosesignalwege in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zum besseren Verständnis der Regulation der Apoptose in humanen PMN sowie zu der Aufklärung der Apoptoseresistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten beitragen. Dadurch können die Kenntnisse über die Rolle von PMN in der humanen Pathologie, z.B. während eines SIRS, vertieft werden. Ferner können die Ergebnisse der Arbeit zum besseren Verständnis der Prozesse beitragen, die für das Abklingen einer Entzündung essentiell sind. Die Identifizierung antiapoptotischer Faktoren und Signalkaskaden kann eine solide Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten schaffen, die bei der Behandlung von SIRS und Sepsis,

aber auch von weiteren inflammatorischen Erkrankungen, die mit einer Neutrophilie einhergehen, fördernd sein kann.

Das ferne Ziel in der PMN-Forschung bleibt, die hochpotenten toxischen Effekte von PMN neutralisieren zu können, ohne das wertvolle antiinflammatorische und antimikrobielle Potential dieser Zellen zu beeinflussen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

BioPhotometer, Eppendorf

Blotkammer für Western Blot (Novex *semi-dry*), Invitrogen

Brutschrank (HeraCell 150), Heraeus

Durchflusszytometriegerät (FACSCalibur), Becton Dickinson

Echtzeit-PCR Gerät (*Real Time*-PCR System 7300), Applied Biosystems

Eis-Blocks (Bio-Rad)

Eismaschine (AF80), Scotsman

Elektrophoresekammer (*mini-protean tetra cell*), Bio-Rad

Elektroporationsgerät (Nukleofektor Amaxa II *Device*), Lonza

Feinwaage (Kern ABJ), Kern & Sohn GmbH

Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40), Zeiss

Geldokumentationsanlage (*Molecular Imager* ChemiDoc), Bio-Rad

Glasplatten für Gelelektrophorese (0,75, 1,0 und 1,5 mm), Bio-Rad

Großzentrifuge (Megafuge 16R), Heraeus

Heizplatte (*dry bath* FB15101), Fischer Scientific

Konfokalmikroskop (cLSM 510 Meta), Zeiss

Kühlschrank (4 °C, -20 °C), Liebherr

Kühlschrank (-80 °C Hera freeze), Heraeus

Lichtmikroskop (Axiovert 40C) Zeiss

MACS Separator mit magnetischem Feld (Miltenyi)

MACS mikro-Auftrennungssäulen (Miltenyi)

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (HeraSafe), Heraeus

Neubauer Zählkammer 0,0025 mm², Tiefe 0,100 mm, Assistent

PCR Gerät (ThermoCycler), Bio-Rad

pH Messgerät (HJ 221), Hanna Instruments

Photometer (Viktor³ 1420), Perkin Elmer

Pipetten, Eppendorf, Peqlab, Reference

Pipettierhilfe Pipetus® , Hirschmann Laborgeräte

Schüttler (KM2), Edmund Bühler GmbH

Schüttler (*see-saw rocker* SSL4), Stuart

Spannungsquelle (*PowerPac* HC), Bio-Rad

Ständer und Rahmen für Gelelektrophorese, Bio-Rad
 Taumelrollenmischer (*rock'n'roller* RM5), CAT
 Thermomixer (Ikamag RH), Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
 Tischzentrifuge (Fresco 17/Pico 17), Heraeus
 Ultraschallprozessor (UP50H mit Sonotrode MS1), Hielscher Ultrasound Technology
 Vortexer (Labinco L46), Welabo
 Waage (Kern 440-45), Kern & Sohn GmbH
 Wasserbad mit Schüttelfunktion, Medingen
 Wasserbad (*Aqualine* AL12), Lauda

3.2 Material

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

BioBlot Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,4 µm), Bio-Rad
 Blotting Filterpapier (Dicke 2,5 mm, 7,5:8,4 cm), Invitrogen
 Deckgläschen (24x32 mm), VWR
 Deckgläschen (15 mm), VWR
 FACS Röhrchen (5 ml), Becton Dickinson
 Falconröhrchen (15 und 50 ml), Greiner Bio-One
 Fluoreszenzküvetten (Schichtdicke 10 mm, 340 nm, 10x4x45), Sarstedt
 Heparin Blutröhrchen (LH102 I.U., 6 ml, 13 x 100 mm), BD Vacutainer
 Kombitips (0,5 und 5 ml), Eppendorf
 Kryoröhrchen, Greiner Bio-One
 Mikrotiterplatten (12-, 24- und 96-well CELLSTAR[®]), Greiner Bio-One
 Pasteurpipetten (3 ml, makro graduert 150 mm, unsteril), Ratiolab
 Pipettenspitzen verschiedener Größen, StarLab
 Plastikpipetten (5, 10 und 25 ml), Costar
 Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml), Eppendorf
 Serum-Blutröhrchen (SST II *advance*, 5 ml, 13 x 100 mm), BD Vacutainer
 Zellkulturflaschen mit Gasaustauschschraubverschluss (Bodenfläche: 75 cm², 250 ml CELLSTAR[®]), Greiner Bio-One

3.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (30 %/Bis Solution 37,5:1), Roth

All-trans-Retinolsäure (ATRA), Sigma
Ammoniumchlorid (0,83 %) Sigma
Ammoniumpersulfat (APS), Sigma
Bromphenolblau, Roth
BSA (Rinderserumalbumin, *bovine serum albumin*), PAA
Chlorophorm, Sigma
Dako *cytomation mounting medium*, Dako
DAPI, Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma
Dithiothreitol (DTT), Imgenex
dNTP-Mix, Qiagen
EDTA, Sigma
Ethanol, Merck
Essigsäure (96 %, Eisessig), Merck
Glycerol, Roth
Glycin, Roth
Isopropanol, Sigma
JC-1, Sigma
Kaliumhydrogencarbonat, Merck
Magermilchpulver, Roth
Mercaptoethanol, Roth
Methanol, Merck
Mitotracker Red CMX Ros, Invitrogen
Molekularbiologisch reines Wasser, 5Prime
Natriumchlorid, Merck
Natriumchlorid, physiologische Lösung 0,9 %, DeltaSelect
Natriumcitrat, Merck
Natriumdeoxycholat, Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), VWR
Nonidet-P40, US Biological
Normales Ziegenserum (*normal goat serum*, NGS), Dako
Paraformaldehyd (PFA), Merck
Percoll (*easycoll separating solution*), Biochrom
Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP), Roche
Poly-D-Lysin Hydrobromid, Sigma

PonceauS, Serva
 Power SYBR[®] Green PCR-Mastermix, Applied Biosystems
Precision plus protein dual-color standards, Bio-Rad
 Propidiumiodid, Sigma
 Proteaseinhibitoren (*complete mini*), Roche
 Protein G mikro-Beads, Miltenyi
 Rothi-Mark *prestained* Proteinmarker, Roth
 RNase-Inhibitor (RiboLock 2500U), Thermo Scientific
 RT-Puffer für RT-PCR (10x), Qiagen
 Staurosporin (STS), Alexis
 Taq-Polymerase-Puffer (10x), Qiagen
 TEMED, VWR
 Trichloressigsäure (TCA), Merk
 TriReagent[®], Sigma
 Tris, Roth
 Tris-Base, Calbiochem
 Triton X-100, Sigma
 Trypanblau, Sigma
 Tween 20, Sigma

3.2.3 Kits

BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific
 DNA-*free* Kit, Ambion
 Extraktionskit für Mitochondrien, Imgenex
 Nukleofektor Kit für humane Monozyten, Lonza
 Omniscript[®] Kit für reverse Transkription, Qiagen
 Phospho-MAPK Array Kit, R&D Systems
UptiLight ultrasensitives HRP Detektions-System für Western Blot, Uptima

3.2.4 Inhibitoren

Inhibitor für Caspasen (BocD-fmk), Biocat
 Inhibitor für p38 α/β (SB203580), Calbiochem
 Inhibitor für PI3K (LY294002), Cayman
 Inhibitor für Proteasom (MG-132), Calbiochem

3.2.5 Antikörper

Tabelle 3.1. Übersicht der primären und sekundären Antikörper für Western Blot.

Antikörper	Ursprungsspezies	Zielspezies	Hersteller
anti-Mcl-1 IgG1, κ monoklonal	Maus	Human	BD Pharmingen
anti-Bax IgG, polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Bid IgG, polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Bad IgG1 (D24-A9), monoklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Bik IgG, polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Bim IgG (C34-C5), monoklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Puma IgG, polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Cytochrom c IgG2b, κ monoklonal	Maus	Human	BD Pharmingen
anti-MnSOD, polyklonal	Kaninchen	Human	Stressmarg Biosciences Inc.
anti-GAPDH IgG1, monoklonal	Maus	Human	Imgenex
anti-phospho-Akt (Serin 473), polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-phospho-GSK-3 α (Serin 21), monoklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-phospho-GSK-3 β (Serin 9), polyklonal	Kaninchen	Human	Cell Signaling
anti-Maus IgG-HRP	Ziege	Maus	Dako
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Kaninchen	Dako

Tabelle 3.2. Übersicht der Antikörper für Co-Immunpräzipitation.

Antikörper	Ursprungsspezies	Zielspezies	Hersteller
anti-Bax IgG, polyklonal (Klon N20)	Kaninchen	Human	Santa Cruz Biotechnology
anti-Mcl-1 IgG1, κ monoklonal	Maus	Human	BD Pharmingen

Tabelle 3.3. Übersicht der Antikörper für Immunfluoreszenz.

Antikörper	Ursprungsspezies	Zielspezies	Hersteller
anti-Bax IgG, polyklonal (Klon N20)	Kaninchen	Human	Santa Cruz Biotechnology
AlexaFluor 488-Konjugat IgG (H+L) F(ab') ₂ Fragment	Ziege	Kaninchen	Cell Signaling

3.2.6 Enzyme

Omniscript[®] Reverse Transkriptase, Qiagen

Taq-Polymerase, Qiagen

3.2.7 Oligonukleotide

Primer für RT-PCR: oligo-(dT)₁₅-Nukleotide, Sigma

Random-Primer, Sigma

Genspezifische Primer für qRT-PCR (human), Sigma:

Mcl-1

forward 5' - CAA GGC ATG CTT CGG AAA CT -3'

reverse 5' - GAT CAT CAC TCG AGA CAA CGA TTT -3'

18S

forward 5' - CAT GGT GAC CAC GGG TGA C-3';

reverse 5' - TTC CTT GGA TGT GGT AGC CG-3';

3.2.8 siRNA

AlexaFluor 488-konjugierte Kontroll-siRNA, Qiagen

Genspezifische Mcl-1 siRNA-Sequenz für Transfektion (human), Qiagen:

Ziel-Sequenz 5' - CCC GCC GAA TTC ATT AAT TTA -3'

Sense Strang 5' - CGC CGA AUU CAU UAA UUU ATT -3'

Antisense Strang 5' - UAA AUU AAU GAA UUC GGC GGG -3'

3.2.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser (Fischar GmbH & Co KG) angesetzt.

Für Herstellung einer reinen Granulozyten-Population:

Erythrozyten-Lyselösung	0,83 % NH ₄ Cl 0,1 % KHCO ₃ 0,004 % EDTA
-------------------------	--

Für Messung der Apoptose nach Nicoletti:

Propidiumiodid-Lösung (Nicoletti-Puffer)	0,1 % Natriumcitrat 0,1 % Triton X-100 50 µg/ml Propidiumiodid
--	--

Für Messung der mitochondrialen Membrandepolarisation:

JC-1-Lösung	760 µM in PBS
-------------	---------------

Für Western Blot:

Trenngel-Puffer, 4x	1,5 M Tris (pH = 8,8) 0,4 % SDS
Sammelgel-Puffer, 4x	0,5 M Tris (pH = 6,8) 0,4 % SDS
10 % Trenngel, pH = 8,8 (für 1 Gel)	H ₂ O 3,125 ml 30 % (v/v) Acrylamid 2,5 ml 4x Trenngel-Puffer 1,875 ml 10 % (v/v) APS 25 µl TEMED 10 µl
12 % Trenngel, pH = 8,8 (für 1 Gel)	H ₂ O 2,625 ml 30 % (v/v) Acrylamid 3 ml 4x Trenngel-Puffer 1,875 ml 10 % (v/v) APS 25 µl TEMED 10 µl
15 % Trenngel, pH = 8,8 (für 1 Gel)	H ₂ O 1,875 ml 30 % (v/v) Acrylamid 3,75 ml 4x Trenngel-Puffer 1,875 ml 10 % (v/v) APS 25 µl TEMED 10 µl
4 % Sammelgel, pH = 6,8 (für 1 Gel)	H ₂ O 3 ml 30 % (v/v) AA 0,65 ml 4x Sammelgel-Puffer 1,25 ml 10 % (v/v) APS 25 µl TEMED 10 µl
SDS-Elektrophorese-Puffer (Elphopuffer)	25 mM Tris, pH = 8,3 - 8,8 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
TBS-T	TBS + 0,1 % (v/v) Tween

TBS	7,7 mM Tris (pH = 7,5) 150 mM NaCl
PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 20 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 100 mM NaCl pH = 7,5
Lämmli-Puffer, 4x	40 % (v/v) Glycerol 250 mM Tris, pH = 6,8 8 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Blockierungs-Lösung	5 % (w/v) Milchmagerpulver/BSA in TBS-T
PonceauS-Lösung	3 % (v/v) TCA 0,1 % (v/v) PonceauS
RIPA Protein-Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, pH = 8 150 mM NaCl 1 % (w/v) Nonidet P-40 1 % (w/v) Na-Deoxycholat 0,1 % (w/v) SDS
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris (pH = 6,8) 2 % SDS 100 mM β-Mercaptoethanol

Für Co-Immunpräzipitation:

Lyse-Lösung	50 mM Tris/HCl, pH = 7,5 150 mM NaCl 1 % TritonX-100 mit Proteaseinhibitoren
Salzreiches Puffer	500 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH = 8 1 % NP-40
Salzarmes Puffer	300 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH = 8 1 % NP-40

3.2.10 Zellen und Zellkulturmedien

Humane myeloide Leukämie-Zelllinie HL-60, Institut für medizinische Mikrobiologie, HHUD

RPMI-1640 (mit 2 mmol/L Glutamin, 2,0 g/l NaHCO₃), Biochrom

Antibiotika (Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml), weiter als P/S abgekürzt, PAA Laboratories

FCS (fötales Kälberserum, *fetal calf serum*), PAA Laboratories

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbecco's *phosphate-buffered saline*, w/o Mg/Ca), Biochrom

Zusammensetzung des Zellkulturmediums:

Zu **RPMI-1640** wurde 1 % (v/v) P/S hinzugefügt. Versuchsabhängig wurde zusätzlich 1 % oder 5 % FCS (v/v) bzw. 1 % oder 5 % Patienten-Serum (v/v) hinzugefügt. Um interindividuelle Unterschiede zu minimieren, wurde standardgemäß ein zu gleichen Teilen gemischtes Serum von mind. 3 Polytrauma-Patienten verwendet.

3.2.11 Software

ABI Prism 7300 System SDS v 1.4 für qRT-PCR, Applied Biosystems

Adobe Photoshop CS3 10.0 für Bildbearbeitung, Adobe

CellQuestPro für durchflusszytometrische Messung, Becton Dickinson

End Note X5 für Zitaten und Literaturverzeichnis, Reuters

GraphPad Prism 5 für Datenauswertung und statistische Analyse, GraphPad Prism

LSM Image Browser, für Bildbearbeitung, Zeiss

MS Office 2010

Primer Express^R 3.0 für Design von genspezifischen Primern, Applied Biosystems

Molecular Imager ChemiDoc XRS und QuantityOne 4.6.5 Basic für Protein- Geldokumentation, Bio-Rad Laboratories

3.3 Methoden

3.3.1 Demografie und die Aufnahmekriterien der Patienten in die Studie

In diese prospektive Studie sind Daten von 37 polytraumatisierten Patienten eingeflossen (11 Frauen und 26 Männer). Als Kontrolle diente ein vergleichbares Kollektiv gesunder Probanden (n = 35, 19 Frauen und 16 Männer). Das durchschnittliche Alter der Polytrauma-Patienten betrug $52,4 \pm 19,2$ Jahre (Altersumfang 22 – 80 Jahre), der Kon-

troll-Probanden $34,0 \pm 9,4$ Jahre (Altersumfang 23 – 52 Jahre). In die Studie wurden Patienten aufgenommen, die eine Verletzungsschwere mit einem *injury severity score* (ISS) ≥ 16 Punkte aufwiesen, sowie einen Aufenthalt auf der Intensivstation (*intensive care unit*, ICU) von mindestens 3 Tagen, und primär im Universitätsklinikum Düsseldorf behandelt wurden. Alle Patienten erfüllten mindestens 2 Kriterien für SIRS (s.u.) am Tag der Aufnahme auf dem ICU und am 1. Tag nach Trauma. Ausgeschlossen aus der Studie wurden polytraumatisierte Patienten mit einem isolierten Schädelhirntrauma sowie mit einer bekannten immunsupprimierenden Vormedikation. Die Blutproben wurden am 1. Tag nach Trauma aus einliegenden arteriellen Kathetern entnommen. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat diese Studie genehmigt (Studiennummer 2633).

Laut der internationalen Sepsis-Konferenz des amerikanischen Kollegiums der Lungenspezialisten (*american college of chest physician*, ACCP) und der Gesellschaft der Intensivmedizin (*society of critical care medicine*, SCCM) von 1991 wird SIRS diagnostiziert, wenn mindestens zwei von vier folgenden klinischen Parametern erfüllt sind (Bone, Balk et al. 1992):

- Fieber ($> 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachypnoe (Atemfrequenz $> 20/\text{min}$) oder Hyperventilation (arterieller Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2) $< 32 \text{ mmHg}$)
- Tachykardie (Herzfrequenz $> 90/\text{min}$)
- Leukozytose (> 12000 weiße Blutkörperchen/ mm^3), Leukopenie ($< 4000/\text{mm}^3$) oder $> 10\%$ unreife Leukozytenformen im Differenzialblutbild (sog. Linksverschiebung).

3.3.2 Methoden der Zellkultur

3.3.2.1 Isolierung und Kultivierung von humanen PMN

Humane PMN wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll aus heparinisiertem venösem Vollblut isoliert. Zur Herstellung einer reinen Population von PMN wurde eine Dichte des Gradienten von 1,086 verwendet, wofür Percoll-Lösung mit der Dichte von 1,124 g/ml mit 0,9 % NaCl verdünnt wurde (5 ml Percoll-Lösung + 3,4 ml NaCl). Die verdünnte Percoll-Lösung wurde langsam mit ca. 5 ml Vollblut in einem 15 ml Falkonröhrchen überschichtet, um eine eventuelle Vermischung der Phasen zu vermeiden. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 25 min bei 2000 rpm und Raum-

temperatur (RT) ohne Bremse. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte sammeln sich die mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) in der Interphase an, wobei sich PMN mit Erythrozyten im Sediment befinden (Abb. 3.1).

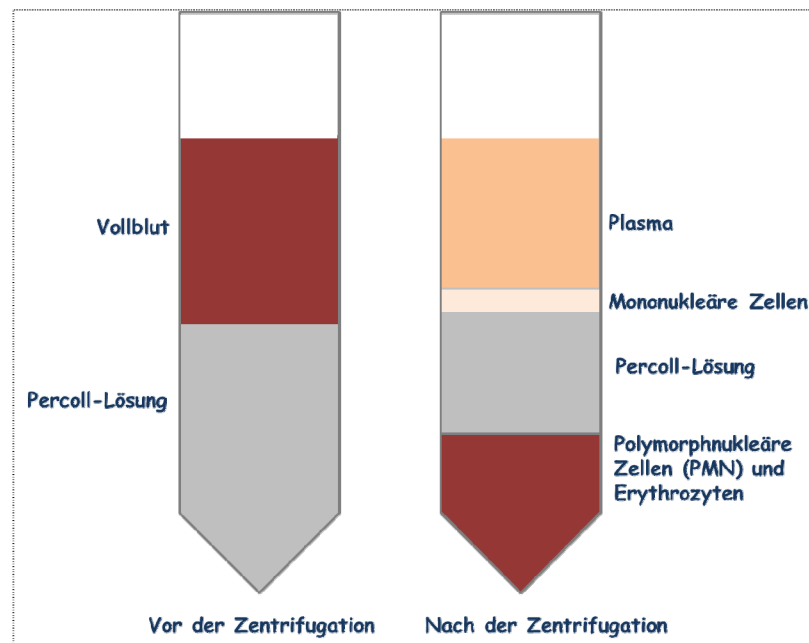


Abbildung 3.1. Zentrifugenröhrchen vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation von Percoll-Lösung mit Vollblut.

8,4 ml verdünnte Percoll-Lösung wird langsam mit ca. 5 ml heparinisiertem venösem Vollblut überschichtet, um eine Vermischung der Phasen zu vermeiden. Nach dem Zentrifugationsschritt (25 min, 2000 rpm ohne Bremse bei RT) sammeln sich die mononukleären Zellen, wie Monozyten und Lymphozyten, in der Interphase an. Die PMN mit Erythrozyten befinden sich im Sediment und die obere Phase enthält Plasma. 5 ml Vollblut wird benötigt, um ca. $1 \cdot 10^7$ PMN zu isolieren.

Zur Lyse der Erythrozyten im Pellet wurde eine isotonische Ammoniumchlorid-Lösung verwendet. Das PMN/Erythrozyten-Pellet wurde in Ammoniumchlorid-Lyselösung resuspendiert und für 7 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1500 rpm und RT und ein Waschschritt mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS). Reinheit und Viabilität der PMN-Population wurde routinemäßig mittels *forward* und *side scatter* im Durchflusszytometer (FACSCalibur) und mittels Trypanblau-Färbung bestimmt und betrug immer > 95 %. Für weitere Experimente wurden Zellen entweder sofort bei -80 °C eingefroren oder im Zellkulturmedium resuspendiert und im Brutschrank bei 37 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

Um die Zellphysiologie nicht unnötig zu beeinträchtigen, eine Prä-aktivierung und das Verklumpen der PMN zu vermeiden, wurde während des gesamten Prozesses der Isolierung ein übermäßig starkes und häufiges Resuspendieren und Schütteln der Zellen sowie abruptes Temperaturwechsel vermieden.

3.3.2.2 Gewinnung von Serum

Das Serum wurde aus venösem Vollblut isoliert. Dafür wurden Blutproben in Serum-Blutröhrchen (SST II *advance* von BD Vacutainer) gesammelt, die im Vergleich zu den Röhrchen für Plasma- oder Blutzellgewinnung keine Antikoagulantien enthalten. Blut gerinnt daher spontan in den Röhrchen und wird in 2 Fraktionen aufgetrennt: Serum und Blutkuchen mit Fibrin. Die Serum-Röhrchen wurden für 10 min bei 3000 rpm und RT abzentrifugiert, wobei sich das Serum im Überstand ansammelt. Anschließend wurde das Serum in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2.3 Kultivierung und Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen

Die Zelllinie HL-60 entstand von einer 36-jährigen Patientin mit akuter myeloider Leukämie (Collins et al. 1977), die aufgrund der Neuevaluierung als akute myeloblastische Leukämie mit Differenzierung (FAB Klasse M2) eingestuft wurde (Dalton et al. 1988). Die Kultivierung von peripheren Leukozyten aus dem Blut dieser Patientin ermöglichte die Etablierung einer wachstumsfaktorenunabhängigen, immortalisierten Zelllinie mit diversen myeloiden Eigenschaften (Gallagher et al. 1979). HL-60 Zellkulturen bestehen aus ausdifferenzierten Zellen, die Myeloblasten- und Promyelozyten-ähnliche Eigenschaften besitzen. Abhängig von den Eigenschaften des Induktors kann die Fähigkeit der myeloiden Zellen erhöht werden, sich zu Granulozyten-ähnlichen oder zu Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen zu differenzieren (Fontana et al. 1981).

So können die Zellen mittels polar-planarer Stoffe, wie Dimethylsulfoxid (DMSO), oder durch andere Substanzen, wie Retinolsäure oder Actinomycin D, zu Neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden, während 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, Phorbolesther und Sodiumbutyrat die Differenzierung zu Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen anregen können (Fontana, Colbert et al. 1981; Fibach et al. 1982). Die Ausdifferenzierung bewirkt zahlreiche Veränderungen in der Zelle, die durch morphologische, histochemische und immunologische Kriterien nachweisbar sind (Graham et al. 1985; Collins 1987). Somit stellt die Zelllinie HL-60 ein attraktives Modell dar, um die Differenzierung von humanen myeloiden Zellen zu untersuchen (Birnie 1988), wobei die ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen eine günstige Alternative für Studien mit humanen PMN darstellen.

HL-60 Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen (75 cm²) herangezuchtet. In der log-Phase bei einer Konfluenz von 75 – 90 % wurden die Zellen passagiert (etwa zweimal pro Woche). Das

Passagieren der Zellen erfolgte durch Zugabe des frischen Mediums (RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS). Die Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen zu Neutrophil-ähnlichen Zellen erfolgte durch Zugabe von all-trans-Retinolsäure (ATRA) in der Konzentration von 1 μ M. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät und mit ATRA für 5 Tage im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Am 5. Tag erfolgte Behandlung und anschließende Kultivierung der Zellen.

HL-60 Zellen entwickeln während der Ausdifferenzierung zu Neutrophil-ähnlichen Zellen viele Charakteristika der reifen PMN, u.a. die Fähigkeit spontane (konstitutive) Apoptose zu begehen (Santos-Beneit et al. 2000). Daher wurde zur Kontrolle der Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen durchflusszytometrisch die Apoptose bestimmt. Für die ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen ist eine ca. 10-fache Erhöhung der Apoptoserate, im Vergleich zu den myeloiden HL-60 Zellen, charakteristisch.

3.3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Um eine bestimmte Zelldichte ausplattieren zu können, wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die auszuzählende Zellsuspension wurde dafür mit Trypanblau-Lösung 1:4 verdünnt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff und kann daher die Membranen lebender Zellen nicht passieren. Tote Zellen können den Farbstoff hingegen aufnehmen, werden blau angefärbt und sind somit im Lichtmikroskop von den vitalen Zellen gut unterscheidbar. Nach Auszählung der vier Großquadrate lässt sich die Anzahl der Zellen/ml nach folgender Formel errechnen:

$$(\text{Zellzahl in 4 Quadraten} \cdot 10^4) / \text{Anzahl von Quadraten (4)} = \text{Zellen/ml},$$

wobei 10^4 der Kammerfaktor ist.

3.3.2.5 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen im Einfriermedium (90 % FCS + 10 % DMSO) bei -180 °C im flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Die Zellen wurden aus der Zellkulturflasche abpipettiert und in ein steriles Falconröhrchen überführt. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei 1000 rpm und RT. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zum langsamen Abkühlen wurden die Röhrchen in ein Einfriergefäß (-1 °C/min) gestellt und über Nacht (ÜN, mind. 18 h) bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen in Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen im vorgewärmten Zellkulturmedium (RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS) aufgenommen, in ein steriles 15 ml Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend im frischen Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Zellkulturflasche (75 cm²) verteilt. Weiterhin wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert.

3.3.3 Durchflusszytometrische Methoden

Durchflusszytometrie (*fluorescent-activating cell sorting*, FACS) ist eine Laser-gestützte Methode zu einer simultanen Quantifizierung mehrerer optischer Eigenschaften von einzelnen Partikeln oder von kompletten Zellen. Mittels Durchflusszytometer können sowohl die Streulicht- (Zellgröße und Zellgranularität) als auch die Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bestimmt werden.

3.3.3.1 Bestimmung der Apoptose (Methode nach Nicoletti)

Die Apoptoserate von PMN bzw. von HL-60 Zellen wurde unter Anwendung der durchflusszytometrischen Analyse mit Propidiumiodid (PI) untersucht. Die Methode wurde 1991 von Nicoletti und Mitarbeitern etabliert (Nicoletti et al. 1991) und stellt seitdem ein weit verbreitetes Verfahren dar, um die Apoptose in verschiedenen experimentellen Modellen zu untersuchen (Riccardi et al. 2006). PI ist ein Fluorochrom, der stöchiometrisch an die Nukleinsäuren bindet (Wallen et al. 1982; Pollack 1990). Somit ist die Emission von PI proportional zu dem DNA- und RNA-Gehalt der Zelle.

Die Nicoletti-Methode beruht auf dem Prinzip, dass die apoptotischen Zellen, unter anderen Merkmalen, fragmentierte DNA aufweisen (Wyllie 1980). Außerdem wird mit dieser Technik eine mögliche Anfärbung der zellulären RNA vermieden. Neben PI enthält der hypotone Nicoletti-Puffer das Detergenz Triton X-100. Dadurch wird nur die Zellmembran, nicht aber die Kernmembran lysiert. Die Zellkerne bleiben intakt und man kann somit nur den zellulären DNA-Gehalt im Durchflusszytometer messen. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigen die mit PI inkubierten apoptotischen Zellen einen breiten, schwächer fluoreszierenden hypodiploiden (sub-G1) Peak, der sich deutlich von dem schmalen Peak der Zellen mit normalem (diploidem) DNA-Gehalt unterscheidet.

Die Apoptoserate wurde entweder direkt nach der Isolierung oder nach der Kultivierung der Zellen bestimmt. Dafür wurden die Zellpellets (mind. $5 \cdot 10^5$ Zellen) im

Nicoletti-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels FACS Analyse. Pro Probe wurden 20000 Zellen gemessen. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Zellen in der Probe bestimmt, die den hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht und folglich für apoptotische Zellen charakteristisch ist.

3.3.3.2 Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation

Die mitochondriale Atmungskette produziert Energie, die als elektrochemisches Potential gespeichert wird. Das elektrochemische Potential besteht aus transmembranem elektrischem Potential, das innen stark negativ geladen ist (-180 bis -200 mV), und einem Protonengradienten von etwa 1 Unit, welcher ausreichend für die ATP-Synthese ist, um energieabhängige zelluläre Prozesse zu gewährleisten (Mitchell 1961; Boyer et al. 1977). In der frühen Phase der Apoptose kommt es zur Ausbildung von Poren in der mitochondrialen Außenmembran und folglich zu der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). Die Veränderung des MMP gilt somit als ein Merkmal der frühen apoptotischen Ereignisse in der Zelle (Petit et al. 1995; Zamzami et al. 1995; Castedo et al. 1996; Zamzami et al. 1996; Fossati, Moulding et al. 2003).

Aufgrund des hohen transmembranen Potentials können intakte funktionierende Mitochondrien lipophile Kationen akkumulieren (Chen 1989). Basierend auf dieser Eigenschaft, wurde die Färbung mit dem metachromatischen 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid (JC-1) etabliert (Smiley et al. 1991). Das lipophile, membranpermeable Kation JC-1 kann in monomerer Form vorliegen oder reversibel in Aggregatform übergehen (Reers et al. 1991; Cossarizza et al. 1996). In vitalen Zellen mit hohem MMP lagert sich JC-1 in der mitochondrialen Matrix in der Aggregatform an und fluoresziert orange-rot. In apoptotischen Zellen kommt es zur Depolarisation der mitochondrialen Membran, so dass JC-1 größtenteils in monomerer Form im Zytosol zurückbleibt und fluoresziert grün (Reers, Smith et al. 1991; Smiley, Reers et al. 1991).

Für die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation wurden PMN bzw. HL-60 Zellen (mind. $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in RPMI + 1 % P/S + 10 % FCS) mit 3 μ M (2 μ g/ml) JC-1 für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte sofort die Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometer. Pro Probe wurden 10000 Zellen gemessen. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Zellen be-

stimmt, der eine Zunahme der Grünfluoreszenz aufwies (FL-1 *shift*), was auf die Depolarisation der Mitochondrien in diesen Zellen hindeutete.

3.3.4 Molekularbiologische Methoden

3.3.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus PMN bzw. aus HL-60 Zellen wurde mittels TriReagent[®] (Sigma-Aldrich) isoliert. Dieses Verfahren ist eine Modifikation vom *single-step* Protokoll für die Isolierung der Gesamt-RNA von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al. 1987). TriReagent[®], eine Mischung aus Guanidinthiocyanat und Phenol in der einphasigen Lösung, löst effektiv DNA, RNA und Proteine in den Zellen oder in den Gewebeproben auf. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde 1 ml TriReagent[®]/5·10⁶ Zellen hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und nachfolgendem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 11200 rpm und 4 °C entstehen 3 Phasen: die organische Phase mit Proteinen, die Interphase mit DNA und die lösliche Phase, die die RNA enthält.

Die Gesamt-RNA wurde mittels Isopropanol präzipitiert. Zu der wässrigen farblosen RNA-haltigen Phase wurde 500 µl Isopropanol/1ml TriReagent[®] hinzugefügt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 11200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und zuletzt in sterilem RNase-freiem Wasser resuspendiert. Zusätzlich wurde ein DNase I Verdau (*rigorous DNase treatment*) mittels DNA-free Kit (Ambion) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden mit der rekombinanten DNase I behandelt, um eine Kontamination der RNA-Probe mit DNA auszuschließen. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Eine intakte und reine RNA ist essentiell, um zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse in der Genexpressionsforschung zu gewährleisten. Die Reinheit der RNA wird normalerweise aus dem A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis bewertet (Baelde et al. 2001). Ein A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von $\geq 1,8$ entspricht einer reinen RNA-Lösung, die nicht durch Proteine und/oder DNA verunreinigt ist (Sambrook J. 1989). Die eluierten RNA-Proben wurden vorerst 1:25 mit sterilem 1 M Tris/HCl-Puffer verdünnt. Zur Bestimmung der Konzentration und Abschätzung der Reinheit der RNA-Lösung wurde die Absorption bei 260

nm und 280 nm gemessen. Die Messung erfolgte in UV-Küvetten am BioPhotometer (Eppendorf). Eine Absorption von $A_{260} = 1$ (bei pH = 7) entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA /ml.

3.3.4.3 Reverse Transkription

Da das in der PCR verwendete Enzym Taq-Polymerase nur DNA-Stränge als Matrize erkennt, muss die isolierte RNA mithilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase in komplementäre DNA (*copy*-DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, das in Retroviren vorkommt. Dieses Enzym benötigt zur Synthese ein Startermolekül (einen Primer), das komplementär an die mRNA bindet. Meist sind das Oligo-dT-Nukleotide (10-15 Deoxythymidine), welche an den poly-A-Schwanz (3'-Ende) der mRNA binden (Nam et al. 2002), oder *random*-Oligonukleotide, bestehend aus mehreren zufällig zusammengesetzten Nukleotiden.

Standardgemäß wurde für die cDNA-Synthese 0,5 µg RNA eingesetzt. Die RNA-Probe wurde mit 10 µl Wasser verdünnt und anschließend der RT-Mix hinzugefügt. Dieser bestand aus:

0,25 µl Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/µl)

2 µl RT-Puffer, 10x

2 µl dNTP-Mix (5 mM)

1 µl Oligo-dT-Primer (20 µM)

2 µl *random*-Primer (8 bp, 100 µM)

0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)

2,5 µl RNase-freies Wasser

Für die Reverse Transkription wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C mittels ThermalCycler (BioRad) inkubiert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für Expressionsanalysen eingesetzt.

3.3.4.4 Quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode der Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR (Mullis et al. 1987) beruht. Die Technik ermöglicht es, die Expression von Genen in „Echtzeit“ zu verfolgen, indem die Messungen des gebildeten Amplifikats nach jedem PCR-Zyklus erfolgen (Schmittgen ; Heid et al. 1996; Klein 2002). Für die Quantifizierung der Amplifikate wurde der sequenzunabhängige DNA-Farbstoff SYBR Green verwendet (Wittwer et al. 1997). SYBR Green weist in der Lösung eine Grund-

fluoreszenz auf, seine inhärente Fluoreszenz wird jedoch erhöht, wenn er in die kleine Furche (*minor groove*) der doppelsträngigen DNA interkaliert (Cosa et al. 2001; Haugland 2001; Zipper et al. 2004). Somit ist die messbare Fluoreszenz proportional zu der Menge an gebildetem Amplifikat.

In der Anlaufphase einer PCR ist die Menge an DNA begrenzt. Am Ende der Reaktion (Plateau-Phase) steigt die Menge des Amplifikats sehr stark an, so dass die Produkte miteinander hybridisieren und folglich die PCR hemmen können. Dazwischen befindet sich die log-Phase (exponentielle Phase). Die Quantifizierung wird daher im linearen Bereich in der log-Phase der PCR vorgenommen, da nur während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Der Zyklus, bei dem die messbare Fluoreszenz in der Probe erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (in die exponentielle Phase übergeht), wird als Schwellenwert-Zyklus (*threshold cycle*, CT) bezeichnet (Pfaffl et al. 2002; Holzapfel 2007).

Für die Quantifizierung wurde als Referenzgen die ribosomale RNA 18S (18S-rRNA) verwendet. Dabei wurde die Expression des Zielgens mit dem Referenzgen normalisiert, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA-/DNA-Probe auszugleichen und zell- und gewebespezifische Unterschiede in der Expression zu minimieren. Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde mittels delta-delta-CT-Methode berechnet (Livak et al. 2001; Schmittgen et al. 2008), die eine Effizienzkorrektur beinhaltet (Pfaffl 2001). Die Expression wurde mithilfe des delta-delta-CT-Wertes als n-fache Genexpression angegeben. Die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte wurde nach Beendigung der Amplifikation mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Die qRT-PCR wurde in einem 7300 *Real-Time* PCR-System (Applied Biosystems) mithilfe von Power SYBR Green PCR-Mastermix (Qiagen) durchgeführt. Die Proben wurden in 96-Well Platten pipettiert, wo gleichzeitig die fluorimetrische Messung von den PCR-Produkten erfolgte. Das Gerät misst bei jedem Zyklus die steigende Fluoreszenz in den Proben und leitet das Signal direkt zur Software. Die Software registriert für jede Probe den CT.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden standardgemäß 2 ng cDNA eingesetzt. Zu jeder Probe (Triplikate) wurde Mastermix hinzugefügt. Dieser bestand aus:

12,5 µl Power SYBR Green PCR-Mastermix, 2x

7 µl H₂O (RNase-/DNase-frei)

0,75 µl *forward* Primer (10 µM)

0,75 µl *reverse* Primer (10 µM)

Anschließend wurde die Platte bei 1000 rpm für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert und direkt der Lauf gestartet.

Laufparameter:

1. Aktivierung der Taq-Polymerase (*hot start*) 10 min bei 95 °C (1 Zyklus)
2. Amplifikation (40 Zyklen)
 - Denaturierung 15 sec 95 °C
 - Annealing 60 sec 60 °C
 - Elongation 30 sec 72 °C
 - Messung 0 sec 81 °C
3. Schmelzkurvenanalyse 0,1 °C/sec (70 – 95 °C)

3.3.4.5 RNA-Interferenz

Über das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) oder *RNA-targeted silencing* wurde erstmalig im Jahr 1990 von Napoli und Mitarbeitern (Napoli et al. 1990) sowie von van der Krol und Mitarbeitern (van der Krol et al. 1990) berichtet. RNAi ist eine spezifische Inaktivierung von Boten-RNA (*messenger*-RNA, mRNA), wobei in der Zelle doppelsträngige RNA (dsRNA) durch DNA- oder RNA-abhängige Synthese hergestellt werden. Solche dsRNA, die normalerweise in der Zelle nicht vorkommen, werden von einer speziellen RNase Dicer erkannt und in kleine 21-23 Nukleotide lang dsRNA oder *short interfering RNA* (siRNA) zerschnitten. Die siRNA besitzen an den beiden 3'-Enden jeweils einen einzelsträngigen Überhang von 2 Nukleotiden. Einer der beiden RNA-Stränge der siRNA wird anschließend in einem Riboproteinkomplex *RNA-induced silencing complex* (RISC) entfernt. Der Abbau eines der beiden Stränge geschieht spezifisch, da mit dem Entwinden der Stränge am thermodynamisch instabileren Ende begonnen wird. Der aktivierte RISC kann dann an die komplementäre Ziel-mRNA binden und diese zerschneiden.

Bereits wenige aktivierte RISC reichen aus, um eine große Anzahl von mRNA in der Zelle zu inaktivieren. Es kommt zu einer drastischen Reduktion der mRNA-Menge in der Zelle. Ebenfalls rasch sinken die Mengen an instabilen Proteinen mit einer kurzen Halbwertszeit, die von mRNA kodiert werden. Bei stabilen Proteinen mit einer hohen Halbwertszeit reicht die Zeit, bei der mRNA-Menge gering gehalten wird, nicht aus, um eine signifikante Abnahme der Proteinexpression zu bewirken (Mülhardt 2006).

3.3.4.5.1 Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von PMN bzw. von HL-60 Zellen wurde die auf Elektroporation basierende Nukleofektor-Technologie (Lonza) angewandt. Die Zellen wurden unter Verwendung des Elektroporationsgerätes *Amaxa II Device* und unter Anwendung des Nukleofektor Kits für humane Monozyten (beides Lonza) elektroporiert. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran kurzfristig durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert. Dadurch kann fremde DNA aus der Lösung in die Zelle, vermutlich durch Diffusion, passieren.

Für die Herunterregulation der Mcl-1-Expression wurden kommerziell erhältliche spezifische siRNA-Sequenzen (Qiagen) verwendet. Die Positivkontrolle enthält siRNA, die an den Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 (Qiagen) gekoppelt ist. Die Transfektionseffizienz wurde nach 1 h durchflusszytometrisch überprüft. Für die Transfektionsexperimente wurde zu $5 \cdot 10^6$ Zellen/100 μ l Transfektions-Lösung (Kit) unterschiedliche Konzentrationen von siRNA (0,5, 1,5 und 2,5 μ g) hinzugefügt und die Zellsuspension in die Elektroporationsküvette überführt. Für die Elektroporation von PMN wurde das Programm Y-001, von HL-60 Zellen – das Programm T-019 verwendet. Anschließend wurden die transfizierten Zellen sofort im vorgewärmten Zellkulturmedium (RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS) aufgenommen und in die Vertiefungen einer 24-Well Platte überführt. Die Zellen wurden nach 24 h für Western Blot Analysen gesammelt, um die Effizienz der Herunterregulation des Zielproteins zu überprüfen. Nach 24 h wurde zu den transfizierten Zellen der Induktor für intrinsische Apoptose Staurosporin (STS) in der Konzentration von 0,2 μ M hinzugefügt, um die Relevanz von Mcl-1 für die intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach schwerem Trauma zu überprüfen. Nach 18 h wurde durchflusszytometrisch die Apoptose bestimmt.

3.3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.3.5.1 Western Blot

Die Western Blot Methode ermöglicht die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, auf der die Proteine anschließend mittels Immundetektion nachgewiesen werden können.

3.3.5.1.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Isolierung von Proteinen wurden frisch isolierte oder kultivierte PMN bzw. HL-60 Zellen im RIPA-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschallprozessor (UP50H, Hielscher Ultrasound Technology) sonifiziert (Sonotrode MS1, Amplitude 80 %, 0,5 Zyklen). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Der Assay basiert auf der Eigenschaft von BCA, einen farbigen Komplex mit Kupferionen Cu^{1+} auszubilden, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Dabei sind zwei Verfahren kombiniert: die herkömmliche Biuretreaktion (Ausbildung eines Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupferkationen Cu^{2+} im basischen Milieu) und die höchst sensitive, kolorimetrische Detektion von reduzierten Kupferionen Cu^{1+} mittels BCA (Smith et al. 1985).

Die sonifizierten Proben wurden vor der Messung 1:6 mit PBS verdünnt und als Duplikate auf eine 96-Well Platte pipettiert. Für die Quantifizierung wurde ein externer Standard (0,0125, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 und 2 mg BSA/ml PBS) verwendet und ebenfalls als Duplikate pipettiert. Anschließend wurde zu den Proben und Standards je 200 μl von *BCA working reagent* hinzugefügt, 30 sec auf dem Schüttler bei RT und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Die quantitative Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Photometer (VICTOR³, Perkin Elmer). Die Proteinproben im RIPA-Puffer wurden bei -80 °C aufbewahrt oder sofort im Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

3.3.5.1.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen Blot werden die Proteine in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, was die Ermittlung des apparenten Molekulargewichtes von einzelnen Proteinen ermöglicht. Standardgemäß wurde 40 - 50 μg des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Vorerst wurden die Proteine mit dem SDS- und β -mercaptoethanolhaltigen Lämmli-Puffer versetzt und 7 min bei 95 °C erhitzt. Das anionische Detergenz SDS bildet Komplexe mit Proteinen und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung, so dass die ursprüngliche Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Somit laufen alle Proteine im Gel gerichtet in Richtung Anode und werden nur ihrer Größe nach aufgetrennt. Außerdem dienen SDS und β -Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer der Zerstörung der nativen Proteinkonformation (Denaturierung) und der Spaltung der Disulfidbrücken (Re-

duktion) von Proteinen. Länge der entfalteten Polypeptide ist dadurch direkt proportional zum Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

Bei einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese wurden Sammel- und Trenngel verwendet (Laemmli 1970). In Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde das geeignete Trenngel ausgewählt. Für Proteine von 10 - 60 kDa wurde ein 15 %-iges, für Proteine von 30 - 120 kDa wurde ein 10 %-iges, für Proteine von 50 - 200 kDa wurde ein 7,5 %-iges Trenngel verwendet (Hashimoto et al. 1983). Die mit dem Lämmli-Puffer versetzten und denaturierten Proteine wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 120 V ca. 1,5 h in einer Elektrophoresekammer (*mini-protean tetra cell*, Bio-Rad). Als Elektrophorese-Laufpuffer diente ein kombiniertes Tris/Glycin-System. Im Sammelgel werden die Proteine an der Grenze zum Trenngel zu einer schmalen, scharfen Bande konzentriert. Im kleinporigen Trenngel werden die Proteine anschließend ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt (Schagger et al. 1987).

3.3.5.1.3 Transfer und Immundetektion

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran im elektrischen Feld übertragen (Towbin et al. 1979; Towbin et al. 1992). Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 23 V für 2,5 h mittels Blotkammer (Novex *semi-dry*, Invitrogen). Auf der Nitrozellulose-Membran bleiben die Proteine aufgrund ionischer und polarer Wechselwirkungen fixiert und sind für die nachfolgende Immundetektion zugänglich. Vor dem Gebrauch wurde die Nitrozellulose-Membran kurz im Transfer-Puffer mit Methanol aktiviert.

Die Effizienz der Übertragung sowie die Auftrennung der Proteine auf der Membran wurden nach dem Blotten mit dem Farbstoff PonceauS kontrolliert. PonceauS ist 3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo)-2,7-naphthalendisulfonsäure, die unspezifisch Protein-banden auf der Membran rot anfärbt. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixiert gleichzeitig die Proteine auf der Membran. Der Farbstoff wurde von der Membran durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und PBS entfernt. Zuletzt wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen.

Vor der eigentlichen Immunfärbung wurden alle freien Bindungsstellen auf der Membran mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Standardgemäß wurden die Membranen in der Blockierungs-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Vor der Behandlung der Membran mit den primären Antikörpern, wie anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-

Dehydrogenase (GAPDH) oder anti-mitochondriale Superoxiddismutase (MnSOD), wurde 5 % BSA in TBS-T als Blockierungs-Lösung verwendet. Für alle anderen Antikörper in dieser Arbeit wurde 5 % Magermilch in TBS-T als Blockierungs-Lösung genommen. Anschließend wurde die Membran mit einem spezifischen primären Antikörper gegen das Zielprotein nach Herstellerangaben inkubiert (s. Tab. 3.4).

Die nachfolgenden Waschschrte mit TBS-T dienten dazu, um unspezifisch gebundene und schwächer haftende Antikörper zu entfernen. Danach folgte eine Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper, der spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet war und der Detektion diente. Es wurde der sekundäre anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege verwendet (beides Dako), der das Enzym/Antikörper-Konjugat darstellt und an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T eingesetzt und die Membran damit für 1 h bei RT inkubiert.

Tabelle 3.4. Die Verdünnungen und die Inkubationsparameter für die primären Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationslösung	Inkubationsparameter
anti-Mcl-1	1:300	1 % Milch in TBS-T	2,5 h bei RT
anti-Cytochrom <i>c</i>	1:2500	1 % Milch in TBS-T	2,5 h bei RT
anti-MnSOD	1:4000	3 % BSA in TBS-T	1,5 h bei RT
anti-Bax	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-Bid	1:1000	5 % Milch in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-Bad	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-Bik	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-Bim	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-Puma	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-phospho-Akt	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-phospho-GSK-3 α	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-phospho-GSK-3 β	1:1000	5 % BSA in TBS-T	ÜN bei 4 °C
anti-GAPDH	1:7500	3 % BSA in TBS-T	1 h bei RT

Zuletzt wurde die Membran erneut mit TBS-T gewaschen und das Signal mittels Chemilumineszenz visualisiert und detektiert. Das Licht wurde in der Geldokumentationsanlage mithilfe von ChemiDoc XRS Programm (Bio-Rad) direkt auf der Membran detektiert. Die Spotintensität auf der Membran korreliert mit der Menge des nachgewiesenen Proteins. Somit erlaubt die Bestimmung der Spotintensität Rückschlüsse auf die relative Menge der Proteine auf der Trägermembran. Zur relativen Quantifizierung der Proteinmenge auf einer Membran wurden die zu bestimmenden Proteinspots unter

Verwendung von QuantityOne Basic Programm (Version 4.6.5, 2000, Bio-Rad) genau markiert und densitometrisch ausgewertet.

Für die semiquantitative Auswertung der Proteinexpression wurde die Membran mit dem Antikörper gegen das Protein GAPDH reinkubiert. Diesem Schritt ging das Strippen der Membran voraus. Dabei wurden die an der Membran haftenden Antikörper entfernt und somit eine zweite Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper ermöglicht. Dazu wurde die Membran für 20 min bei 60 °C mit β -Mercaptoethanol- und SDS-haltigem Stripping-Puffer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden β -Mercaptoethanol und SDS von der Membran durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und PBS entfernt. Zuletzt wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen.

3.3.5.2 Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz können Antigene mithilfe von Antikörpern, die an die fluoreszierenden Farbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind, detektiert werden. Die Signale von Antigen/Antikörper-Strukturen werden unter einem Immunfluoreszenzmikroskop visualisiert. Hier wurde diese Methode angewandt, um die subzelluläre Lokalisation von dem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie Bax in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten nach Aktivierung des intrinsischen sowie des extrinsischen Signalwege zu untersuchen.

3.3.5.2.1 Subzelluläre Lokalisation

Als erstes wurden PMN auf Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) immobilisiert. Um die Adhärenz von PMN zu erhöhen, wurden die Deckgläschen mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml in PBS) beschichtet. Die Deckgläschen wurden vorerst abgeflammt, mit 200 μ l Poly-D-Lysin überschichtet und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde Poly-D-Lysin von den Deckgläschen entfernt, zweimal mit sterilem PBS gewaschen und sofort verwendet.

Frisch isolierte oder kultivierte PMN ($5 \cdot 10^5$ bzw. 10^6 Zellen/ml) wurden auf die beschichtete Deckgläschen pipettiert, die in die Vertiefungen einer 12-Well Platte gelegt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit Mitotracker Red CMX Ros (Invitrogen) in der Konzentration von 100 nM für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser mitochondrien-spezifische Farbstoff kann passiv durch die Membran lebender Zellen einwandern und besitzt eine Thiol-reaktive Chloromethylgruppe. Dank dieser reaktiven Gruppe kann Mitotracker mit den Mitochondrien assoziieren (Poot et al. 1996). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Zellkulturmedium (RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS) gewa-

schen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und für weitere 20 min mit PBS + 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert.

Für die Bestimmung der zellulären Lokalisation von Bax wurde der Antikörper gegen dieses Protein verwendet (polyklonal aus Kaninchen, Klon N20, Santa Cruz Biotechnology). Vorerst wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Ziegenserum (*normal goat serum*, NGS) in PBS + 0,3 % Triton X-100 blockiert und mit dem anti-Bax Antikörper ÜN bei 4 °C in der Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit dem sekundären AlexaFluor 488-gekoppelten Antikörper (Cell Signaling) inkubiert.

Für die Färbung von Zellkernen wurde die nukleinsäurespezifische DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol)-Färbung durchgeführt. Der Farbstoff DAPI interkaliert überwiegend in die kleine Furche (*minor groove*) der doppelsträngigen DNA und fluoresziert bei der Anregung mit UV-Licht blau (Kubista et al. 1987). Die behandelten Deckgläschen wurden dazu mit der beschichteten Seite auf die Objektträger gelegt und in *fluorescent mounting* Medium (Dako) mit 2 µg/ml DAPI (Sigma) eingedeckelt. Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Bax erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (cLSM 510 Meta, Zeiss). Um die Spezifität der Bax-Färbung zu überprüfen, wurde die Färbung mit dem sekundären AlexaFluor 488-gekoppelten Antikörper durchgeführt.

3.3.5.3 Subzelluläre Fraktionierung (Isolierung der Mitochondrien)

Um die subzelluläre Lokalisation von den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie Bax und Bid zu untersuchen sowie eine mögliche Translokation dieser Proteine zu den Mitochondrien nach Einleitung des intrinsischen und des extrinsischen Apoptose-signalwege in Kontroll- und Patienten-PMN zu analysieren, wurde in dieser Arbeit eine Zellfraktionierung unter Anwendung des Extraktionskits für Mitochondrien (Imgenex) durchgeführt. Um möglichst reine zytosolische und mitochondriale Zellfraktionen zu erzielen und die Zerstörung der Mitochondrien zu vermeiden, wurde die Fraktionierung entweder in frisch isolierten PMN oder direkt nach der Kultivierung der PMN durchgeführt, ohne die Zellpellets einzufrieren. Die Experimente wurden nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Als erstes wurden die Zellen ($1,5 \cdot 10^7$ Zellen) in dem Homogenisierungspuffer (Kit) resuspendiert, 20 min auf Eis unter Schütteln inkubiert und anschließend sonifiziert. Um Zellmembranen und Debris zu entfernen, wurde die Zellsuspension 15 min

bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (enthält mitochondriale und zytosolische Fraktionen) wurde erneut für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C anzentrifugiert. Das gewonnene Pellet beinhaltete die Mitochondrien, der Überstand war die zytosolische Fraktion. Das mitochondriale Pellet wurde im mitochondrialen Lyse-Puffer (Kit) resuspendiert und kurz sonifiziert. In den zytosolischen und mitochondrialen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend die Translokation der Zielproteine mittels Western Blot Technik untersucht.

Für die semiquantitative Auswertung der Bax- und Bid-Proteinexpression in beiden Fraktionen wurden die Membranen mit den spezifischen Antikörpern gegen Proteine GAPDH sowie MnSOD reinkubiert. GAPDH ist ein typisch zytosolisches, MnSOD ein typisch mitochondriales Protein. Daher diente gleichzeitig die GAPDH- und MnSOD-Färbung dazu, um die Effizienz der Zellfraktionierung zu überprüfen.

3.3.5.4 Co-Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation können Antigene aufgereinigt und anschließend detektiert werden. Zuerst wird das Zielprotein mithilfe spezifischer Antikörper gebunden. Dieser Immunkomplex kann dann unter Anwendung von Antikörper-bindenden Proteinen (meistens Protein A und/oder G) aus der Gesamtprotein-Lösung präzipitiert werden. Die Antikörper-bindenden Proteine sind in der Regel an die Beads gekoppelt (wie z.B. Sepharose- oder Eisen-Beads), so dass der Immunkomplex schnell und effizient aus der Lösung eluiert werden kann. Die eluierte Fraktion kann anschließend mittels Western Blot Analyse untersucht werden.

Co-Immunpräzipitation basiert auf dem Prinzip der Immunpräzipitation und wird angewandt, um das Zielprotein mitsamt seiner potentiellen Interaktionspartner zu präzipitieren. Mittels Western Blot Technik können entsprechend neben dem primären Antigen auch die Interaktionspartner nachgewiesen werden.

Für den Nachweis von möglichen Interaktionspartnern des Mcl-1-Proteins wurde die μ MACS-Technologie (Miltenyi) angewandt. Dabei wurde das Zielprotein aus dem Gesamtprotein-Lysat mittels spezifischen anti-Mcl-1 Antikörper (monoklonal aus Maus, BD Pharmingen) präzipitiert, das seinerseits an das Protein G-gekoppelte μ -Eisen-Beads gebunden war. Der magnetische Immunkomplex wurde anschließend auf eine μ MACS-Auftrennungssäule gegeben, die sich im starken magnetischen Feld eines Separators (beides Miltenyi) befand. Das markierte Mcl-1-Protein blieb mit seinen Interaktionspartnern in der Säule haften, während die ungebundenen Proteine ausgewa-

schen werden konnten. Anschließend wurde auch das Zielprotein mitsamt Interaktionspartner mittels Lämmli-Puffer eluiert.

Es wurde nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers gearbeitet. Während der gesamten Prozedur wurde ein starkes Schütteln und Resuspendieren der Proben vermieden, um die Proteinkomplexe nicht zu zerstören. Zellpellets (mind. $1 \cdot 10^7$ Zellen) wurden in 1 ml Lyse-Puffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) aufgenommen und 30 min auf Eis unter sanftem Schwenken inkubiert. Nach dem Zentrifugationsschritt (10 min bei 10000 rpm und 4 °C) wurde zu dem Überstand der anti-Mcl-1 Antikörper in der Konzentration von 2 µg/ml, sowie 50 µl/ml von Protein G/µ-Beads hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert.

Nach dem Äquilibrieren der µ-Auftrennungssäulen mit dem Lyse-Puffer (ohne Protease- und Phosphataseinhibitoren) wurden die Gesamtprotein-Lysate auf die Säulen gegeben. Um unspezifische Bindungen zu lösen, wurden die Säulen vorerst mit den salzhaltigen Puffern gewaschen: zweimal mit dem salzreichen und nachfolgend zweimal mit dem salzarmen Puffer. Die zwei anschließenden Waschschrte mit 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH = 7,5) dienten zum Entfernen der Salze aus den Säulen. Zuletzt wurden die Säulen mit 20 µl Lämmli-Puffer mit 5 % β-Mercaptoethanol (erhitzt bei 95 °C) für 5 min inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mit 50 µl Lämmli-Puffer mit 5 % β-Mercaptoethanol (ebenfalls erhitzt bei 95 °C) aus den Säulen eluiert. Die Proteinproben wurden gesammelt und bei -80 °C eingefroren oder sofort mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Um eine unspezifische Bindung von µ-Eisen-Beads an die Proteine auszuschließen, wurde Co-Immunpräzipitation mit leeren Beads ohne Antikörper durchgeführt. Zur Kontrolle der Mcl-1-Co-Immunpräzipitation wurde eine reziproke Co-Immunpräzipitation vom potentiellen Mcl-1-Interaktionspartner Bax mittels spezifischen anti-Bax Antikörper (polyklonal aus Kaninchen Klon N-20, Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt.

3.3.6 Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels ANOVA Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*), kombiniert mit dem Newman-Keuls Test unter Verwendung von GraphPad Prism Programm (5. Version). p-Werte < 0,05 wurden als signifikant

bewertet. Die Anzahl von gleichartigen, unabhängig durchgeführten Tests für die jeweiligen Experimente ist als „n“ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 In PMN aus Polytrauma-Patienten sind die Mengen von phosphorylierten Kinasen Akt, p38 und GSK-3 erhöht

Die vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe und die von anderen haben gezeigt, dass sich PMN aus Polytrauma-Patienten durch eine verzögerte Apoptose, im Vergleich zu PMN gesunder Probanden, charakterisieren. Die verlängerte Lebensspanne der PMN nach einem schweren Trauma ist auf Wachstumsfaktoren und Zytokine zurückzuführen, die in erhöhten Konzentrationen im Serum polytraumatisierter Patienten vorzufinden sind (Ayala et al. 1990; Tanaka et al. 1996; Coxon et al. 1999; Dibbert, Weber et al. 1999; Dinarello 2000). Die Verzögerung der Apoptose in PMN aus Polytrauma-Patienten ist außerdem durch eine gestörte intrinsische Apoptose bedingt und korreliert mit der erhöhten Expression vom antiapoptotischen Faktor Mcl-1 (Paunel-Gorgulu et al. 2009). Die Vorinkubation von PMN aus gesunden Probanden mit dem Serum von Polytrauma-Patienten führt zu einer verzögerten spontanen sowie induzierten intrinsischen Apoptose in diesen Zellen, was mit der Stabilisierung des Proteinlevels von Mcl-1 einhergeht (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Dieser Effekt lässt sich ebenfalls in der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 reproduzieren (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Ziel von nachfolgenden Experimenten war es, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die den Serum-mediierten Effekt auf die verzögerte Apoptose und auf die erhöhte Expression von Mcl-1 in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln.

Die Phosphorylierungskaskaden sind für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen und somit für die Regulation der PMN-Apoptose essentiell (Akgul, Moulding et al. 2001). Kinasen modulieren den Phosphorylierungsstatus und demzufolge die Stabilität vieler Apoptose-regulierenden Proteine, u.a. von Mcl-1, und können insofern an der Vermittlung des Serum-mediierten antiapoptotischen Effektes in humanen PMN beteiligt sein. Um zu untersuchen, welche Kinasen in PMN aus Polytrauma-Patienten phosphoryliert und somit aktiv sind, wurde im Rahmen eines Vorversuches der Phospho-MAPK Array (R&D Systems) durchgeführt. Dabei wurden in PMN aus Polytrauma-Patienten, im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden, erhöhte Mengen an phosphorylierten Formen der Proteinkinase B 2 (Akt2) und der Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinase MSK2 detektiert (Abb. 4.1).

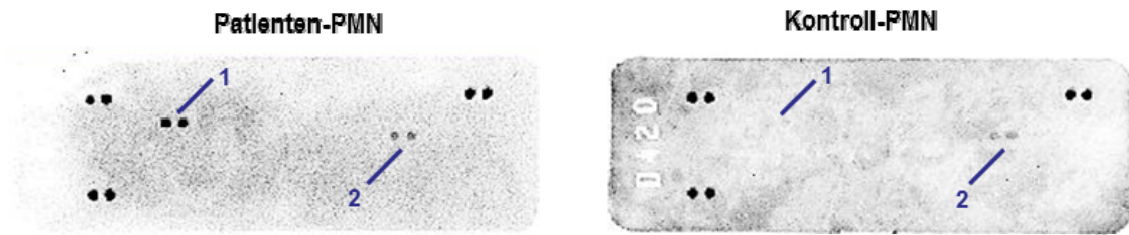


Abbildung 4.1. Erhöhte Mengen von phosphorylierten Kinasen in PMN aus Polytrauma-Patienten, isoliert am 1. Tag nach Trauma (Patienten-PMN), im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN). 1 – Akt2, 2 – MSK2. Jede Membran wurde mit einem zu gleichen Teilen gemischten Gesamtprotein-Lysat von zwei PMN-Spendern inkubiert. Dargestellt sind die repräsentativen Aufnahmen von zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse bestätigen zum Teil die Daten der Vorversuche unserer Arbeitsgruppe (nicht publizierte Daten). Im Rahmen dieser Experimente wurden erhöhte Mengen an phosphorylierten Formen der Mitogen-aktivierten Kinase (MAPK) p38 δ und Glykogensynthase-Kinase 3 α/β (GSK-3 α/β) in PMN aus Polytrauma-Patienten, im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden, detektiert. Die GSK-3 ist jedoch, im Vergleich zu anderen hier aufgeführten Kinasen, in der phosphorylierten Form (am Serin 9 und 21) inaktiv. Diese Phosphorylierungs-bedingte Inaktivierung wird durch die Kinase Akt vermittelt (Cross, Alessi et al. 1995). In den ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen konnten nach der Behandlung mit dem Serum von Polytrauma-Patienten (1. Tag nach Trauma) ebenfalls erhöhte Mengen an phosphorylierten Formen der Kinasen p38 δ und GSK-3 α/β detektiert werden. Außerdem wurden Signale für die phosphorylierten Kinasen Akt1, Akt2, Akt pan, ribosomale s6 Kinase 1 (RSK1) sowie p38 γ detektiert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vor allem die Kinasen Akt, p38 und GSK-3 eine Rolle in der Regulation der PMN-Apoptose nach einem schweren Trauma spielen können.

4.2 Die Kinasen PI3K/Akt und p38 sind am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt in PMN und in HL-60 Zellen beteiligt

In Anlehnung an die Vorversuche dieser Arbeit sowie aktuelle Literatur wurde in den nachfolgenden Experimenten die Rolle der Kinasen PI3K/Akt und p38 in der spontanen PMN-Apoptose sowie ihre Beteiligung am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt analysiert. Dafür wurden spezifische pharmakologische Inhibitoren für den PI3K/Akt-Signalweg sowie für die MAP Kinase p38 verwendet. Für die Inhibierung von p38 wurde der Inhibitor SB203580, für die Inhibierung von PI3K/Akt wurde der Inhibitor LY294002 eingesetzt.

Zuerst wurden die Experimente mit der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 durchgeführt. Die kann mithilfe von all-trans-Retinolsäure (ATRA) zu Neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden, die als Modell für humane PMN dienen. Die ausdifferenzierten HL-60 Zellen wurden im Zellkulturmedium (RPMI-1640 + 1 % P/S + 1 % FCS) aufgenommen und mit der Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in die Vertiefungen einer 24-Well Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), mit dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M), sowie mit der Kombination beider Inhibitoren (40 μ M SB203580 und 10 μ M LY294002) für 20 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach 20 min erfolgte die Zugabe von 5 % FCS bzw. 5 % Serum von Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum) für weitere 3,5 h. Nach 3,5 h und 18 h Inkubation der ausdifferenzierten HL-60 Zellen mit den Inhibitoren wurde die Gen- sowie die Proteinexpression von Mcl-1 mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Außerdem wurde nach 18 h Inkubation die Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt.

Der gleiche Ansatz wurde anschließend in frisch isolierten PMN aus Polytrauma-Patienten sowie in PMN aus gesunden Probanden durchgeführt. PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) wurden, wie HL-60 Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren, in An- bzw. Abwesenheit des Patienten-Serums inkubiert. Die frisch isolierten PMN aus Polytrauma-Patienten wurden direkt im RPMI-1640 + 1 % P/S + 5 % FCS aufgenommen und mit den Inhibitoren, wie oben beschrieben, behandelt. Nach 3,5 h Inkubation wurde durchflusszytometrisch die Depolarisation der mitochondrialen Membran, nach 18 h Inkubation die Apoptose bestimmt. Außerdem wurde nach 3,5 h und 18 h Inkubation die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Analyse untersucht.

Die Inkubation von ausdifferenzierten HL-60 Zellen mit dem Patienten-Serum für 18 h bewirkte eine Verzögerung der Apoptose (Abb. 4.2). Die Hemmung von p38 mit dem Inhibitor SB203580 und die Hemmung von PI3K mit dem Inhibitor LY294002 bewirkten eine bis zu ca. 2-fache Zunahme der Apoptoserate in HL-60 Zellen, im Vergleich zur Kontrolle. LY294002 konnte komplett die antiapoptotische Wirkung vom Patienten-Serum in HL-60 Zellen aufheben und führte zu einer 2-fachen signifikanten Erhöhung der Apoptoserate. Der Effekt von SB203580 auf die Apoptose in HL-60 Zellen, inkubiert mit dem Patienten-Serum, war im Vergleich zu LY294002, deutlich vermindert. SB203580 konnte den antiapoptotischen Effekt vom Patienten-Serum in HL-60 Zellen nur zum Teil überwinden. Die Behandlung mit SB203580 zeigte einen leichten ca. 1,4-fachen Anstieg der Apoptoserate in diesen Zellen.

Um zu untersuchen, ob beide Kinasen eine redundante Rolle in der Regulation der Apoptose in HL-60 Zellen spielen, wurde die Kombination aus beiden Kinaseinhibitoren verwendet. Die Inhibitoren wurden in den optimalen Konzentrationen eingesetzt (40 μ M SB203580 und 10 μ M LY294002), um eine mögliche synergistische proapoptotische Wirkung auf HL-60 Zellen zu vermeiden. Die Kombination aus beiden Inhibitoren führte zu einer ca. 2,4-fachen signifikanten Erhöhung der Apoptoserate, im Vergleich zur Kontrolle, und konnte den Serum-mediierten antiapoptotischen Effekt in HL-60 Zellen komplett aufheben (Abb. 4.2).

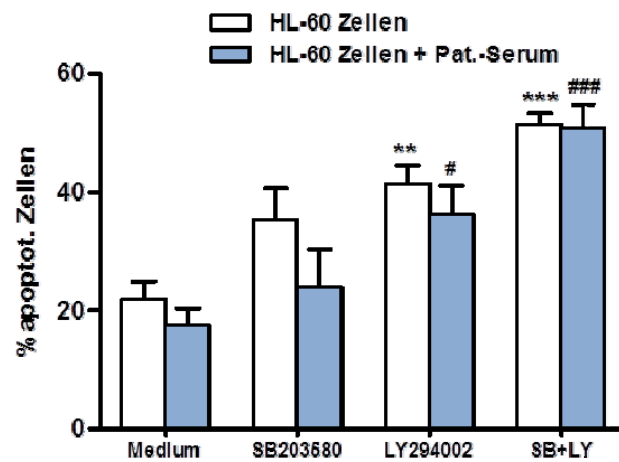


Abbildung 4.2. Inhibitoren für PI3K und p38 hemmen den antiapoptotischen Effekt vom Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum) in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen.

Ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden in RPMI-1640 + 1 % P/S + 1 % FCS aufgenommen, mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination beider Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert, und für weitere 18 h in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum kultiviert. Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. ** < 0,005, *** < 0,0005 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen); # < 0,05, ### < 0,0005 im Vergleich zur Serum-Kontrolle (unbehandelte Zellen + Pat.-Serum). n = 6.

Um zu untersuchen, ob PI3K/Akt und p38 an der Serum-mediierten Stabilisierung von Mcl-1 beteiligt sind, wurde nach der Vorinkubation der ausdifferenzierten HL-60 Zellen mit SB203580 und LY294002 und anschließender Inkubation in An- bzw. Abwesenheit des Patienten-Serums für 3,5 h und 18 h die Expression von Mcl-1 untersucht. Die Analyse der Mcl-1 mRNA-Expression hat gezeigt, dass in Serum-behandelten ausdifferenzierten HL-60 Zellen Mcl-1 mRNA-Level nach 3,5 h, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, unverändert blieb, und nach 18 h leicht erhöht war (Abb. 4.3A-B). LY294002 bewirkte nach 3,5 h eine 2-fache signifikante Abnahme (Abb. 4.3A) und nach 18 h Inkubation eine 4-fache signifikante Abnahme (Abb. 4.3B) des Mcl-1 mRNA-Levels in ausdifferenzierten HL-60 Zellen. SB203580 alleine führte zu einer ca. 2-fachen, und in der Kombination mit LY294002 zu einer ca. 6-fachen sig-

nifikanten Abnahme der Mcl-1 mRNA-Expression nur nach 18 h Inkubation. Außerdem kam es zu einer bis zu 3-fachen signifikanten Abnahme des Mcl-1 mRNA-Levels nach der Inkubation der ausdifferenzierten HL-60 Zellen mit den Inhibitoren einzeln und in der Kombination in Anwesenheit von Patienten-Serum für 18 h (Abb. 4.3B).

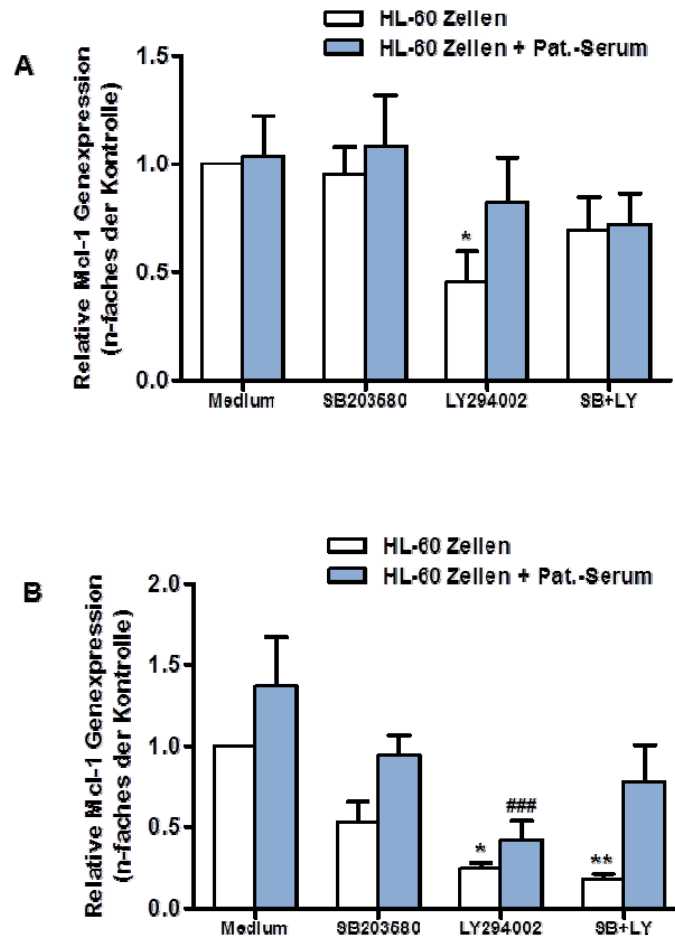


Abbildung 4.3. Mcl-1 mRNA-Expression nach Behandlung der ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).

Ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert, und für weitere 3,5 h bzw. 18 h in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum inkubiert. Nach 3,5 h (A) bzw. 18 h (B) wurde die Expression von Mcl-1 auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR untersucht und auf die mRNA-Expression des Referenzgens 18S normiert. Die Daten für die Mcl-1 mRNA-Expression wurden anschließend mit der Mcl-1 mRNA-Expression in der Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Genexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05, ** < 0,005 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen); ### < 0,0005 im Vergleich zur Serum-Kontrolle (unbehandelte Zellen + Pat.-Serum). n = 6.

Der Mcl-1-Proteinlevel war nach 3,5 h Inkubation von HL-60 Zellen mit dem Patienten-Serum 1,7-fach signifikant erhöht, und dieser Effekt hielt bis zu 18 h an (Abb. 4.4). LY294002 alleine und in der Kombination mit SB203580 führten zu einer bis zu ca. 4-fachen signifikanten Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels nach 3,5 h (Abb. 4.4A) und 18 h Inkubation (Abb. 4.4B). Eine komplette signifikante Überwindung der Serum-

induzierten erhöhten Mcl-1-Proteinexpression wurde nach 3,5 h und 18 h Inkubation der ausdifferenzierten HL-60 Zellen mit den Inhibitoren einzeln und in der Kombination dokumentiert. Diese Ergebnisse weisen demnach auf die Beteiligung von PI3K/Akt und p38 in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt sowie an der Serum-induzierten erhöhten Expression von Mcl-1 vor allem auf Protein- aber auch auf mRNA-Ebene hin.

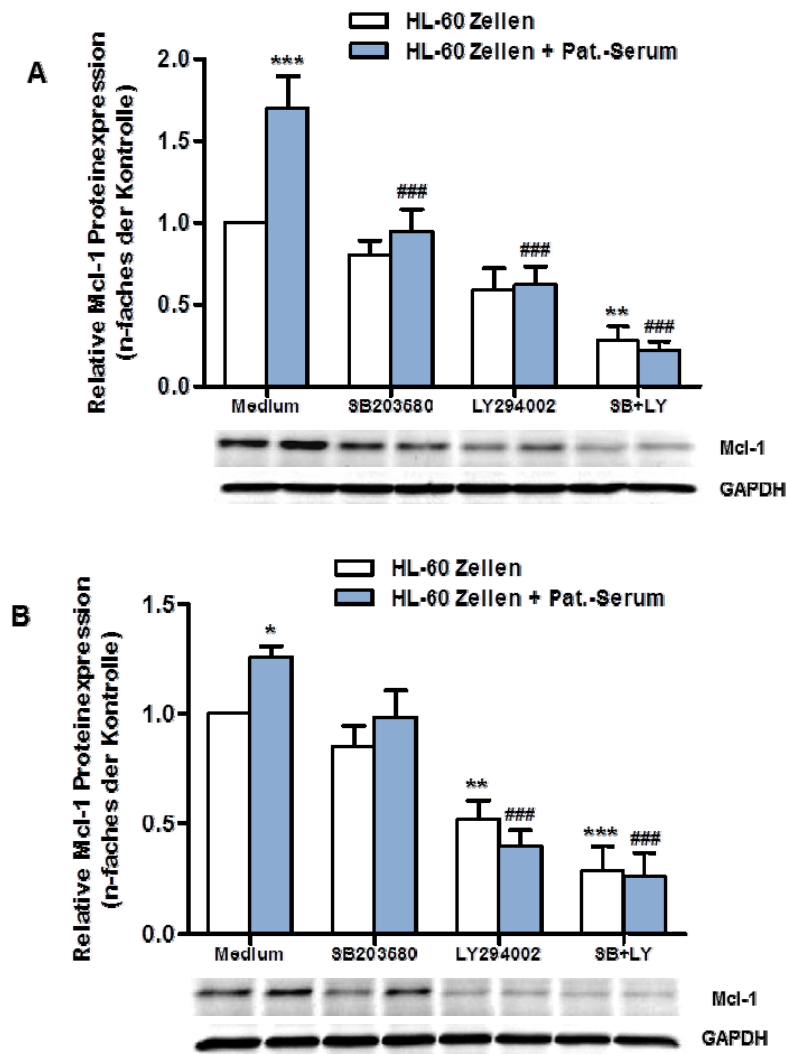


Abbildung 4.4. Mcl-1-Proteinexpression nach Behandlung der ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).

Dargestellt sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. Ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert, und für weitere 3,5 h bzw. 18 h in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum inkubiert. Nach 3,5 h (A) bzw. 18 h (B) wurde die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Technik analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05, ** < 0,005, *** < 0,0005 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen); ### < 0,0005 im Vergleich zur Serum-Kontrolle (unbehandelte Zellen + Pat.-Serum). n = 6.

Aus Abb. 4.5 ist ersichtlich, dass die Inkubation der PMN von gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit dem Patienten-Serum eine Verzögerung der Apoptose, im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-PMN, bewirkte. PMN aus Polytrauma-Patienten zeigten ebenfalls, im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-PMN, eine niedrigere Apoptoserate. Die Hemmung von p38 mit dem Inhibitor SB203580 und die Hemmung von PI3K mit dem Inhibitor LY294002 bewirkten nur in Kombination eine 2-fache signifikante Zunahme der Apoptoserate in Kontroll-PMN, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.5). LY294002 und SB203580 einzeln und in Kombination konnten die antiapoptotische Wirkung von Patienten-Serum in Kontroll-PMN zum Teil aufheben und führten zu einer bis zu 2-fachen, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Apoptoserate in diesen Zellen. In Patienten-PMN bewirkten LY294002 und SB203580 sowie die Kombination beider Inhibitoren eine bis zu 1,6-fache nicht signifikante Erhöhung der Apoptoserate (Abb. 4.5). Generell zeigte die Kombination aus beiden Inhibitoren einen leicht verstärkten Effekt auf die Apoptose in allen Zellgruppen.

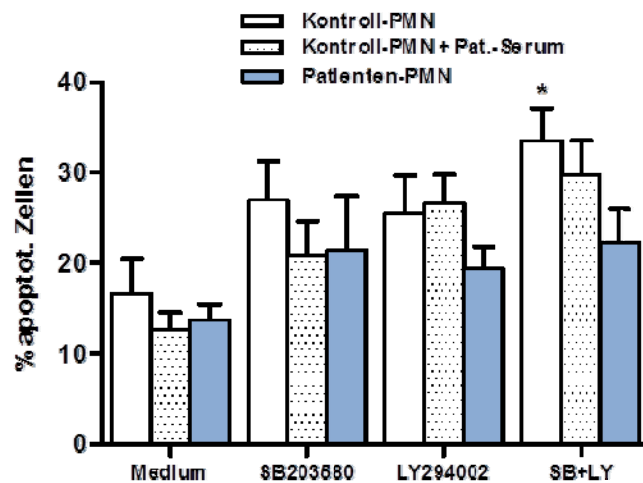
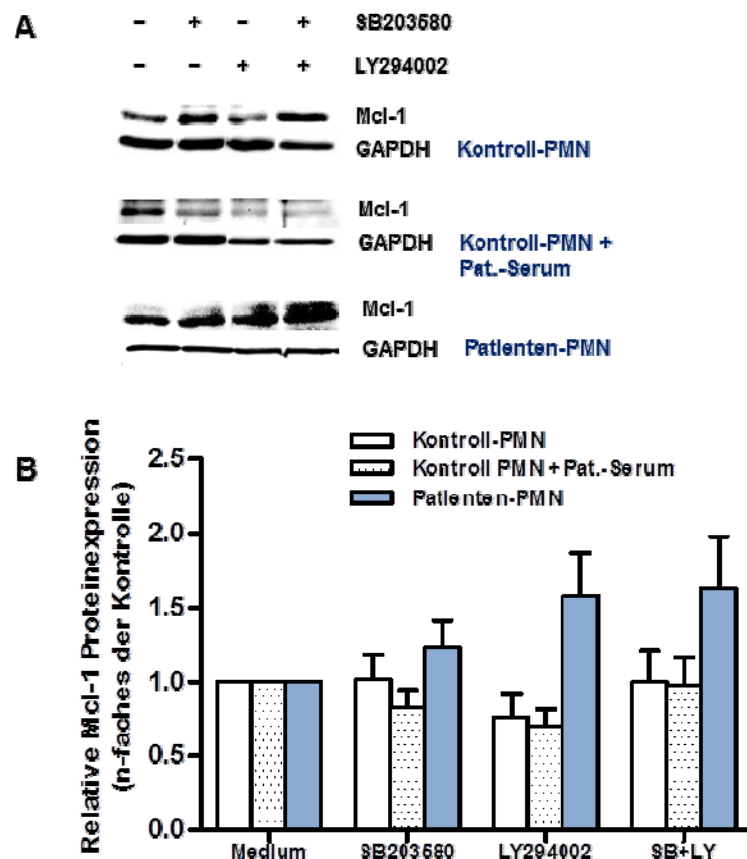


Abbildung 4.5. Anteil der apoptotischen Zellen nach Inkubation von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Inkubation von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden wurden in RPMI-1640 + 1 % P/S + 1 % FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert und für weitere 18 h in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum inkubiert. PMN aus Polytrauma-Patienten wurden direkt in RPMI-1640 + 1 % P/S + 5 % FCS aufgenommen und mit den Inhibitoren für 18 h inkubiert. Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. * < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Kontroll-PMN). n $\geq$ 7.

Wie aus repräsentativen Western Blot-Aufnahmen ersichtlich ist, korrelierte die verzögerte Apoptose in PMN aus gesunden Probanden, inkubiert mit dem Patienten-Serum, sowie in Patienten-PMN mit der erhöhten Proteinexpression von Mcl-1 nach 3,5

h (Abb. 4.6A) und 18 h (Abb. 4.6C). Die Inkubation von Kontroll- und Patienten-PMN mit den Inhibitoren einzeln und in Kombination bewirkte keine signifikanten Veränderungen der Mcl-1-Proteinexpression zu den beiden untersuchten Zeitpunkten. SB203580 und LY294002 einzeln und in Kombination zeigten lediglich eine bis zu 1,4-fache nicht signifikante Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels nach 3,5 h Inkubation der Kontroll-PMN sowie Kontroll-PMN, inkubiert mit dem Patienten-Serum (Abb. 4.6B). Nach 18 h Inkubation wurde kein signifikanter Effekt auf die Mcl-1-Proteinexpression in diesen Zellen beobachtet (Abb. 4.6D). Auf repräsentativen Western Blot-Aufnahmen ist jedoch zu sehen, dass LY294002 und SB203580 einzeln und in Kombination die Serum-induzierte erhöhte Mcl-1-Proteinexpression in Kontroll-PMN einzelner Spender zu den beiden untersuchten Zeitpunkten überwinden konnten (Abb. 4.6A, C). In Patienten-PMN kam es zu einer deutlichen Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels nach 3,5 h Inkubation mit den Inhibitoren (Abb. 4.6A-B), obgleich eine 2,3-fache, jedoch nicht signifikante Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels nach 18 h Inkubation mit der Kombination aus beiden Inhibitoren dokumentiert wurde (Abb. 4.6D).



Legende und Abb. 4.6C, D – s. nächste Seite

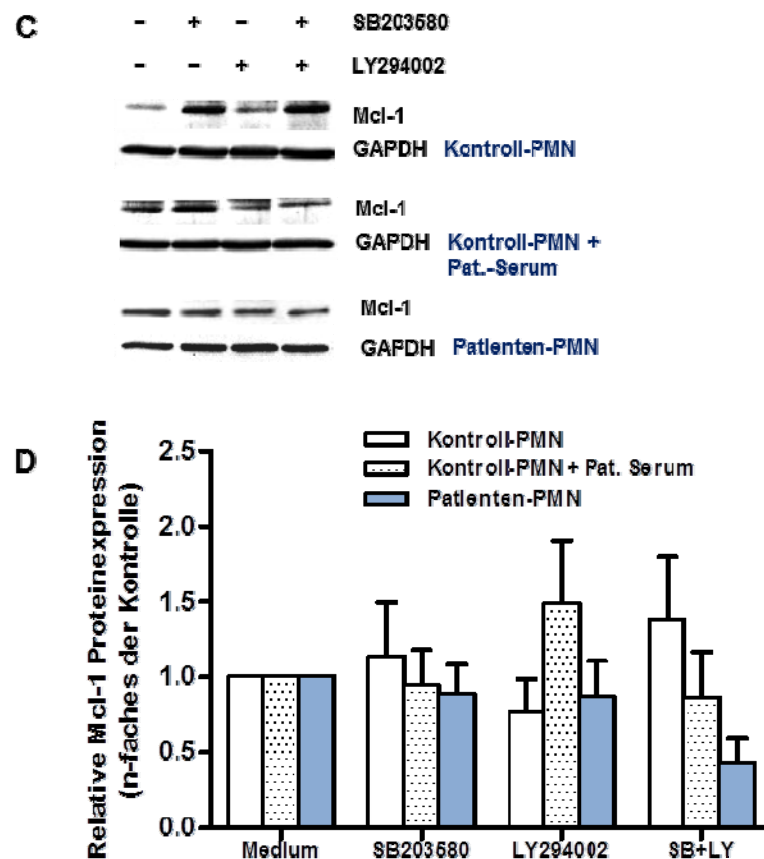


Abbildung 4.6. Mcl-1-Proteinexpression nach Behandlung von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Behandlung von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.

A, C – Repräsentative Western Blot-Aufnahmen; **B, D** – Densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression in Patienten-PMN sowie in Kontroll-PMN, inkubiert in Ab- bzw. Anwesenheit von Patienten-Serum. Kontroll-PMN wurden mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert, und für weitere 3,5 h (**A, B**) bzw. 18 h (**C, D**) in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum inkubiert. Patienten-PMN wurden mit den Inhibitoren für 3,5 h (**A, B**) bzw. 18 h (**C, D**) in Anwesenheit von 5 % FCS inkubiert. Nach 3,5 h bzw. 18 h wurde in Kontroll- und Patienten-PMN die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Technik analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression für jede Zellgruppe wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der jeweiligen Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. $n \geq 6$.

Es ist bekannt, dass die Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie z.B. Mcl-1, die Integrität der Mitochondrien und somit die frühe Phase der Apoptose – die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) in humanen PMN kontrollieren. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob der Expressionslevel des Mcl-1-Proteins nach 3,5 h Auswirkungen auf das mitochondriale Membranpotential (MMP) in humanen PMN hat.

Das basale MMP in Kontroll-PMN bei der spontanen Apoptose nach 3,5 h war in diesem Experiment bereits extrem niedrig, so dass eine Serum-vermittelte Stabilisierung von MMP zu diesem Zeitpunkt nicht auftrat. Der Inhibitor SB203580 bewirkte nur in Kombination mit LY294002 eine 9-fache signifikante Erhöhung der Zellzahl mit

niedrigem MMP nach 3,5 h in Kontroll-PMN, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.7). SB203580 alleine zeigte dabei eine 8-fache nicht signifikante, LY294002 eine 2-fache nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl mit niedrigem MMP. In Kontroll-PMN, inkubiert mit dem Patienten-Serum, führte die Inkubation der Zellen mit den Kinaseinhibitoren einzeln sowie in Kombination zu einer bis zu 8-fachen, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Zellzahl mit niedrigem MMP, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.7).

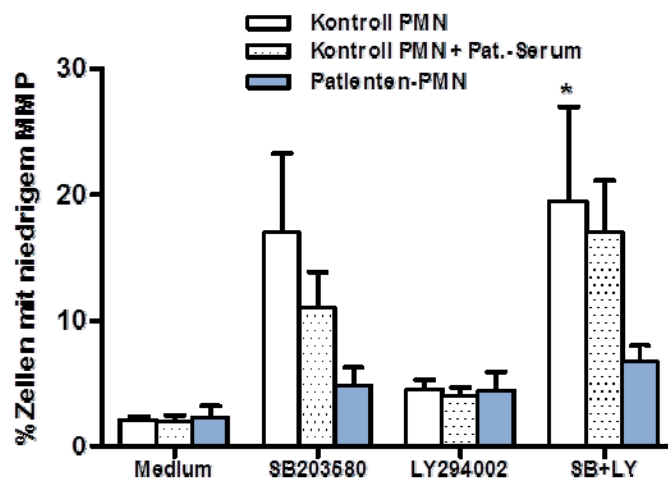


Abbildung 4.7. Depolarisation der mitochondrialen Außenmembran nach Inkubation von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Behandlung von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden wurden in RPMI-1640 + 1 % P/S + 1 % FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Inhibitor für PI3K LY294002 (25 μ M), dem Inhibitor für p38 SB203580 (40 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M LY294002 und 40 μ M SB203580) für 20 min vorinkubiert, und für weitere 3,5 h in Anwesenheit von 5 % FCS bzw. 5 % Patienten-Serum inkubiert. PMN aus Polytrauma-Patienten wurden direkt in RPMI-1640 + 1 % P/S + 5 % FCS aufgenommen und mit den Inhibitoren für 3,5 h inkubiert. Nach 3,5 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die eine Zunahme der Grünfluoreszenz aufwiesen (FL-1 shift), was auf die Depolarisation der mitochondrialen Außenmembran in diesen Zellen hindeutet. * < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Kontroll-PMN). n $\geq$ 7.

Generell konnten die beiden Inhibitoren einzeln und in Kombination das basale MMP in Kontroll-PMN aufheben. Dies korrelierte mit der leichten Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels nach 3,5 h sowie einem leichten Anstieg der Apoptoserate nach 18 h durch LY294002 und SB203580 in Anwesenheit des Patienten-Serums. In Patienten-PMN bewirkten beide Inhibitoren einzeln und in Kombination nach 3,5 h einen bis zu ca. 3-fachen nicht signifikanten Anstieg der Zellzahl mit niedrigem MMP, was allerdings mit der Stabilisierung des Mcl-1-Proteins zu diesem Zeitpunkt einherging. Nach 18 h Inkubation von Patienten-PMN mit den Inhibitoren korrelierte wiederum eine leichte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels mit einem leichten Anstieg der Apoptoserate.

Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Beteiligung von PI3K/Akt und p38 am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt sowie an der Serum-medierten erhöhten Mcl-1-Proteinexpression in humanen PMN hin.

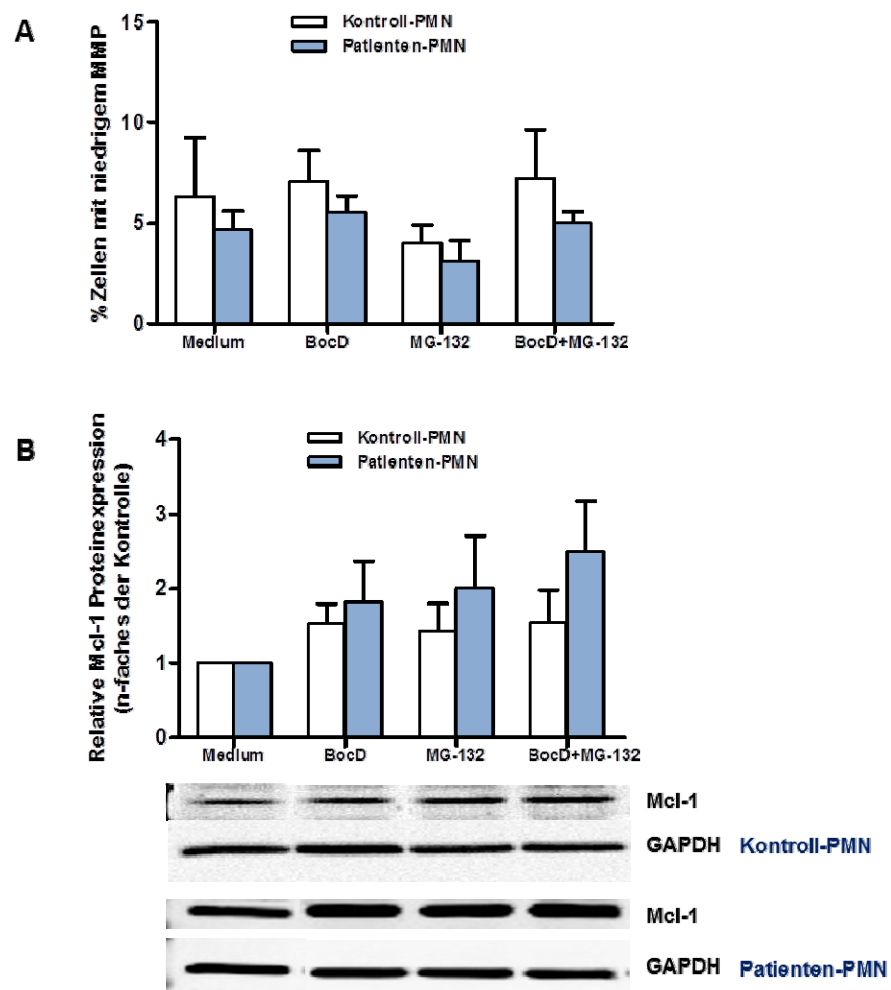
4.3 Caspasen und Proteasom sind an dem Apoptose-induzierten Abbau von Mcl-1 in PMN beteiligt

Neben den Kinasen kann die Expression und somit die Halbwertszeit von Mcl-1, ein prädominanter Apoptose-regulierender Faktor in humanen PMN, posttranslational durch Polyubiquitinylierung und Abbau in den Proteasomen (Zhong, Gao et al. 2005) oder durch Caspasen reguliert werden (Clohessy, Zhuang et al. 2004; Derouet, Thomas et al. 2006; Cross et al. 2008). Daher sollte als Nächstes die Rolle des Proteasoms und von Caspasen in der Regulation des Apoptose-induzierten Abbaus von Mcl-1 in PMN unter physiologischen Bedingungen sowie in PMN nach einem schweren Trauma untersucht werden.

Frühere Studien der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass PMN aus Polytrauma-Patienten sich durch eine gestörte intrinsische Apoptose charakterisieren, die mit der erhöhten Expression von Mcl-1 korreliert. Die Resistenz gegen den intrinsischen Apoptoseinduktor Staurosporin (STS) kann in PMN aus Polytrauma-Patienten nach der Einleitung des extrinsischen Apoptosesignalweges mittels Aktivierung des Fas-Rezeptors (FasR) überwunden werden (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009; Paunel-Gorgulu et al. 2011).

Frisch isolierte PMN aus Polytrauma-Patienten sowie PMN aus gesunden Probanden wurden in RPMI-1640 + 1 % P/S + 5 % FCS mit der Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in die Vertiefungen einer 24-Well Platte ausgesät. PMN wurden für 30 min mit dem spezifischen Inhibitor für Proteasom MG-132 (10 μ M), mit dem Breitbandinhibitor für Caspasen Boc-aspartyl(OMe)fluoromethylketon (BocD-fmk, 100 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M MG-132 und 100 μ M BocD) vorinkubiert. Zur Einleitung der intrinsischen Apoptose erfolgte anschließend die Zugabe von STS (0,2 μ M), zur Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges die Zugabe vom anti-Fas IgM Antikörper (Klon CH-11, 200 ng/ml) für weitere 3,5 h bzw. für 18 h. Nach 3,5 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation und nach 18 h die Messung der Apoptose. Außerdem wurde nach 3,5 h die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Technik untersucht.

Nach der Inkubation von Kontroll- sowie von Patienten-PMN mit dem Inhibitor für Caspasen BocD einzeln und in Kombination mit dem Inhibitor für Proteasom MG-132 wurden keine signifikanten Veränderungen des MMP nach 3,5 h (Abb. 4.8A) und eine bis zu 2-fache nicht signifikante Abnahme der Apoptoserate nach 18 h (Abb. 4.8C) dokumentiert. Der Inhibitor für Proteasom MG-132 bewirkte dagegen in Kontroll- und in Patienten-PMN eine leichte Abnahme der Zellzahl mit niedrigem MMP (Abb. 4.8A) und zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 4.8C). Dies korrelierte mit einer bis zu ca. 2,5-fachen Erhöhung des Mcl-1-Proteinlevels in Kontroll- und in Patienten-PMN nach 3,5 h (Abb. 4.8B). Dies besagt, dass vor allem Caspasen, aber auch Proteasom eine Rolle in der Regulation der spontanen PMN-Apoptose sowie des Mcl-1-Abbaus während der spontanen Apoptose in beiden Zellgruppen spielen.



Legende und Abb. 4.8C – s. nächste Seite

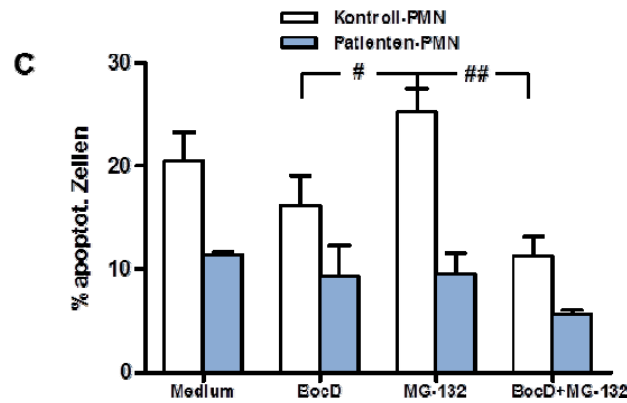
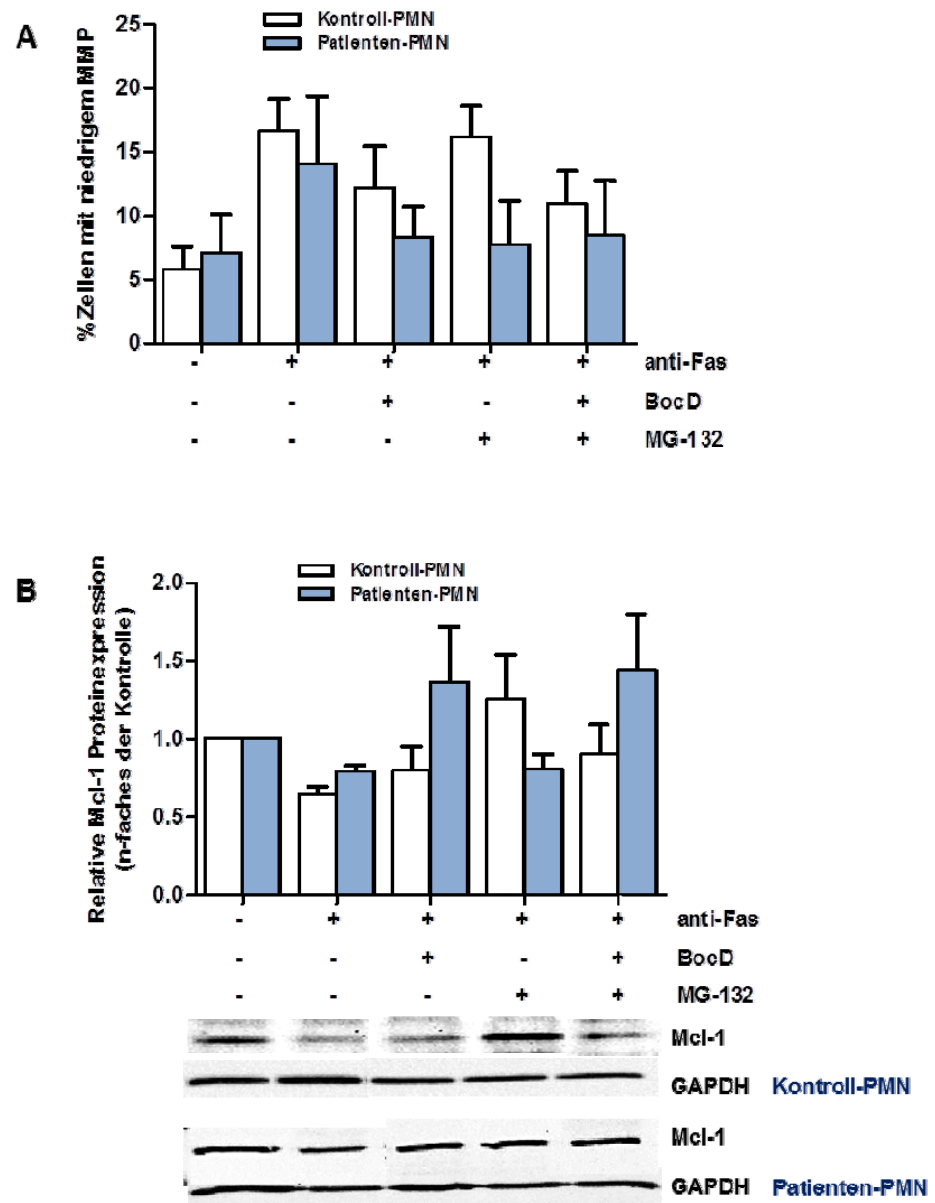


Abbildung 4.8. Effekt von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden bzw. aus Polytrauma-Patienten wurden mit dem Inhibitor für Caspasen BocD-fmk (100 μ M), dem Inhibitor für Proteasom MG-132 (10 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M MG-132 und 100 μ M BocD-fmk) für 3,5 h inkubiert. **A** - Nach 3,5 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die eine Zunahme der Grünfluoreszenz aufwiesen (FL-1 *shift*), was auf die Depolarisation der Mitochondrien in diesen Zellen hindeutet. **B** - Nach 3,5 h wurde zusätzlich die Proteinexpression von Mcl-1 analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der jeweiligen Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. Abgebildet sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. **C** - Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. # < 0,05, ## < 0,005. n $\geq$ 5.

Nach der Inkubation der Kontroll- und Patienten-PMN mit dem anti-Fas IgM Antikörper wurde eine bis zu ca. 3-fache Erhöhung der Zellzahl mit niedrigem MMP nach 3,5 h dokumentiert (Abb. 4.9A). Diese korrelierte mit einer bis zu ca. 1,6-fachen nicht signifikanten Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels zu diesem Zeitpunkt (Abb. 4.9B) sowie mit einer bis zu 3,5-fachen signifikanten Erhöhung der Apoptoserate nach 18 h (Abb. 4.9C). Der unspezifische Inhibitor für Caspasen BocD konnte in Patienten-PMN komplett, in Kontroll-PMN jedoch nur zum Teil den Fas-medierten Effekt auf das MMP und auf die Mcl-1-Proteinexpression aufheben. In beiden Zellgruppen konnte BocD den Fas-induzierten apoptotischen Effekt nach 18 h signifikant überwinden. Der Inhibitor für Proteasom MG-132 konnte in Kontroll-PMN die Fas-induzierte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels, jedoch nicht die Fas-induzierte Abnahme des MMP und die Erhöhung der Apoptose, aufheben. Es kam dabei zu einem leichten Anstieg der Zellzahl mit niedrigem MMP nach 3,5 h und zu einem 2-fachen signifikanten Anstieg der Apoptoserate nach 18 h, obgleich eine Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, dokumentiert wurde. In Patienten-PMN konnte MG-132 die Fas-induzierte Abnahme des MMP leicht hemmen, jedoch nicht vor Fas-induzierten Apoptose und der Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels schützen. Es wurde eine leichte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels und eine ca. 3,7-fache Erhöhung der

Apoptoserate dokumentiert. Die Kombination aus beiden Inhibitoren konnte, ähnlich wie BocD alleine, die PMN beider Gruppen vor der Fas-induzierten Apoptose schützen, was mit der Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels und mit einer Hemmung der mitochondrialen Membrandepolarisierung nach 3,5 h korrelierte (Abb. 4.9).



Legende und Abb. 4.9C – s. nächste Seite

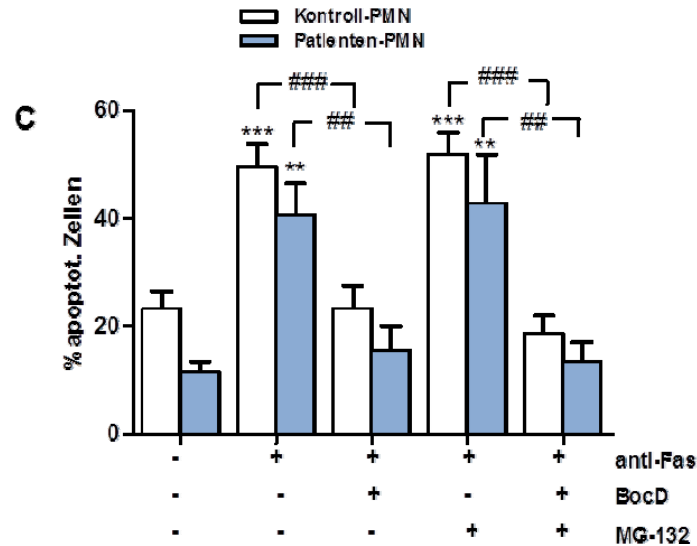


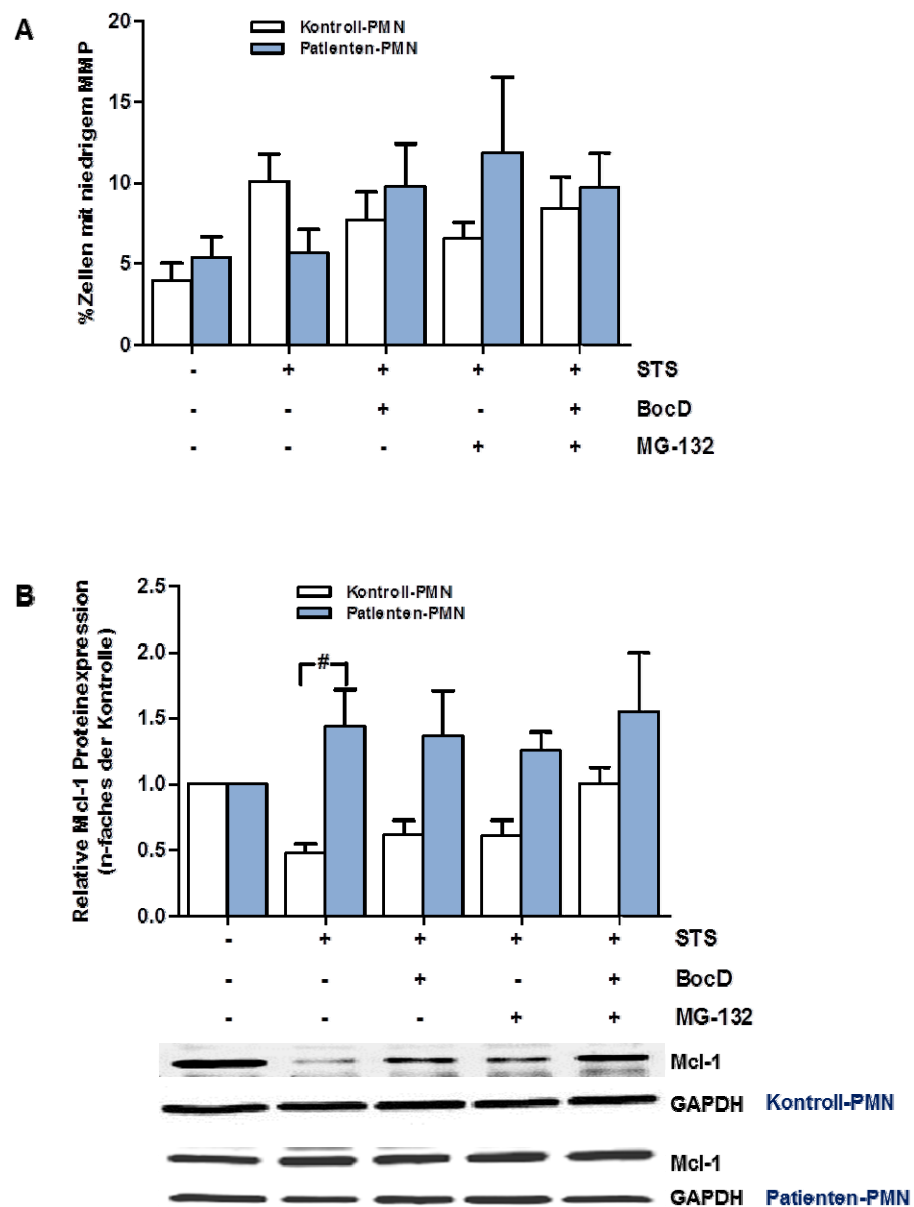
Abbildung 4.9. Effekt vom anti-Fas IgM Antikörper in Anwesenheit von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden bzw. aus Polytrauma-Patienten wurden mit dem Inhibitor für Caspasen BocD-fmk (100 μ M), dem Inhibitor für Proteasom MG-132 (10 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M MG-132 und 100 μ M BocD-fmk) für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen für weitere 3,5 h anti-Fas IgM (200 ng/ml) zugegeben. **A** - Nach 3,5 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die eine Zunahme der Grünfluoreszenz aufwiesen (FL-1 *shift*), was auf die Depolarisation der Mitochondrien in diesen Zellen hindeutet. **B** - Nach 3,5 h wurde zusätzlich die Proteinexpression von Mcl-1 analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der jeweiligen Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. Abgebildet sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. **C** - Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. ** < 0,005, *** < 0,0005 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Kontroll-PMN); ## < 0,005, ### < 0,0005. n $\geq$ 6.

Im Weiteren wurde der Mcl-1-Abbau nach der Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges mittels STS untersucht. Die PMN aus Polytrauma-Patienten zeigen aufgrund der gestörten intrinsischen Apoptose eine Resistenz gegen STS, die mit der Stabilisierung des Mcl-1-Proteins korreliert (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Bestätigend dafür wurden auch in diesen Experimenten keine Veränderung des MMP nach 3,5 h (Abb. 4.10A) sowie keine Erhöhung der Apoptoserate nach 18 h Inkubation der PMN aus Polytrauma-Patienten mit STS, im Vergleich zu unbehandelten Patienten-PMN, beobachtet (Abb. 4.10C). Außerdem wurde eine 2-fache Abnahme des Mcl-1 Proteinlevels nach 3,5 h Inkubation mit STS in Kontroll-PMN, im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-PMN, beobachtet. In Patienten-PMN wurde dagegen eine deutliche Stabilisierung dieses Proteins dokumentiert (Abb. 4.10B).

Der Inhibitor für Caspasen BocD und der Inhibitor für Proteasom MG-132 konnten einzeln und in Kombination die STS-induzierte Abnahme des MMP nach 3,5 h in Kontroll-PMN nur leicht aufheben (Abb. 4.10A). BocD alleine und in Kombination mit

MG-132, jedoch nicht MG-132 alleine, konnten die STS-induzierte Apoptose nach 18 h in Kontroll-PMN komplett überwinden (Abb. 4.10C). Weder BocD noch MG-132 einzeln konnten allerdings den STS-induzierten Mcl-1-Abbau nach 3,5 h hemmen: es kam zu einer bis zu 1,6-fachen nicht signifikanten Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels. Die Kombination aus beiden Inhibitoren zeigte in diesem Versuch einen stabilisierenden Effekt auf die Mcl-1-Proteinexpression und konnte die STS-induzierte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels aufheben (Abb. 4.10B). In Patienten-PMN bewirkten Caspasen- und Proteasominhibitor nach Zugabe von STS, ähnlich wie STS alleine, keine signifikanten Effekte auf die Apoptose sowie einen stabilisierenden Effekt auf das Protein Mcl-1 (Abb. 4.10).



Legende und Abb. 4.10C – s. nächste Seite

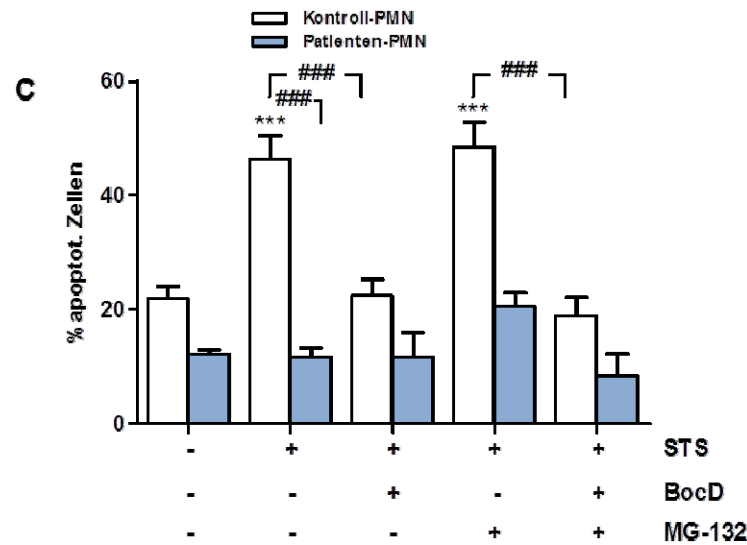


Abbildung 4.10. Effekt von Staurosporin (STS) in Anwesenheit von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden bzw. aus Polytrauma-Patienten wurden mit dem Inhibitor für Caspasen BocD-fmk (100 μ M), dem Inhibitor für Proteasom MG-132 (10 μ M) sowie mit der Kombination aus beiden Inhibitoren (10 μ M MG-132 und 100 μ M BocD-fmk) für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen für weitere 3,5 h STS (0,2 μ M) zugegeben. **A** - Nach 3,5 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der mitochondrialen Membrandepolarisation. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die eine Zunahme der Grünfluoreszenz aufwiesen (FL-1 *shift*), was auf die Depolarisation der Mitochondrien in diesen Zellen hindeutet. **B** - Nach 3,5 h wurde zusätzlich die Proteinexpression von Mcl-1 analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der jeweiligen Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. Abgebildet sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. **C** - Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. *** < 0,0005 im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Kontroll-PMN); # < 0,05, ### < 0,0005. n $\geq$ 5.

Daraus lässt sich schließen, dass vor allem Caspasen in der Regulation der Fas-induzierten Apoptose in Kontroll- und Patienten-PMN, und in der Regulation der STS-induzierten Apoptose in Kontroll-PMN involviert sind. Der Fas-induzierte Abbau von Mcl-1 in Kontroll-PMN wird vermutlich in erster Linie durch Proteasom, in Patienten-PMN in erster Linie durch Caspasen reguliert, wogegen bei der STS-induzierten Apoptose in Kontroll-PMN in gleichem Maße Caspasen und Proteasom am Abbau von Mcl-1 beteiligt sind.

4.4 Das Serum von Polytrauma-Patienten kann die Staurosporin-induzierte Abnahme der phosphorylierten Kinasen Akt und GSK-3 aufheben

Die intrinsische Apoptoseresistenz gegen STS in PMN aus Polytrauma-Patienten korreliert, wie oben gezeigt, mit der Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels. Die Kinasen PI3K/Akt und p38 sind an der Vermittlung des Serum-medierten antiapoptotischen Effektes sowie der Serum-induzierten erhöhten Mcl-1-Proteinexpression in PMN beteiligt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kinase Akt sowie die distal agierende GSK-3 die Expression von Mcl-1 durch posttranslationale Modifikationen, und somit die Stabilisierung dieses Faktors direkt modulieren können (Cross, Alessi et al. 1995; Maurer, Charvet et al. 2006; Zhao, Altman et al. 2007).

Als Weiteres wurde daher untersucht, ob das Serum polytraumatisierter Patienten die Aktivität der Kinasen Akt und GSK-3 während der Einleitung des intrinsischen Apoptosesignalweges mittels STS modulieren, und evtl. dadurch den stabilisierenden Effekt auf das Mcl-1-Protein ausüben und so die intrinsische Apoptoseresistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten vermitteln kann. Dafür wurden frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden in RPMI-1640 + 1 % P/S mit der Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in die Vertiefungen einer 24-Well Platte ausgesät, mit 1 % FCS bzw. 1 % Serum von Polytrauma-Patienten für 1 h vorinkubiert und anschließend mit STS (0,2 μ M) für 30 min, 1 h und 3 h behandelt. Nach diesen Zeitpunkten wurde die Proteinexpression von phosphorylierten Formen der Kinasen Akt und GSK-3 mittels Western Blot Technik untersucht.

Die Inkubation von Kontroll-PMN mit STS für 30 min zeigte keinen Effekt auf den Expressionslevel der phosphorylierten Form von Akt, wobei eine leichte Abnahme der phosphorylierten aktiven Akt nach 1 h und 3 h Inkubation der Kontroll-PMN einzelner Spender mit STS dokumentiert wurde. Die Behandlung von Kontroll-PMN mit dem Patienten-Serum in Ab- und Anwesenheit von STS resultierte in einer deutlichen Stabilisierung der phosphorylierten Akt-Form (Abb. 4.11A, B).

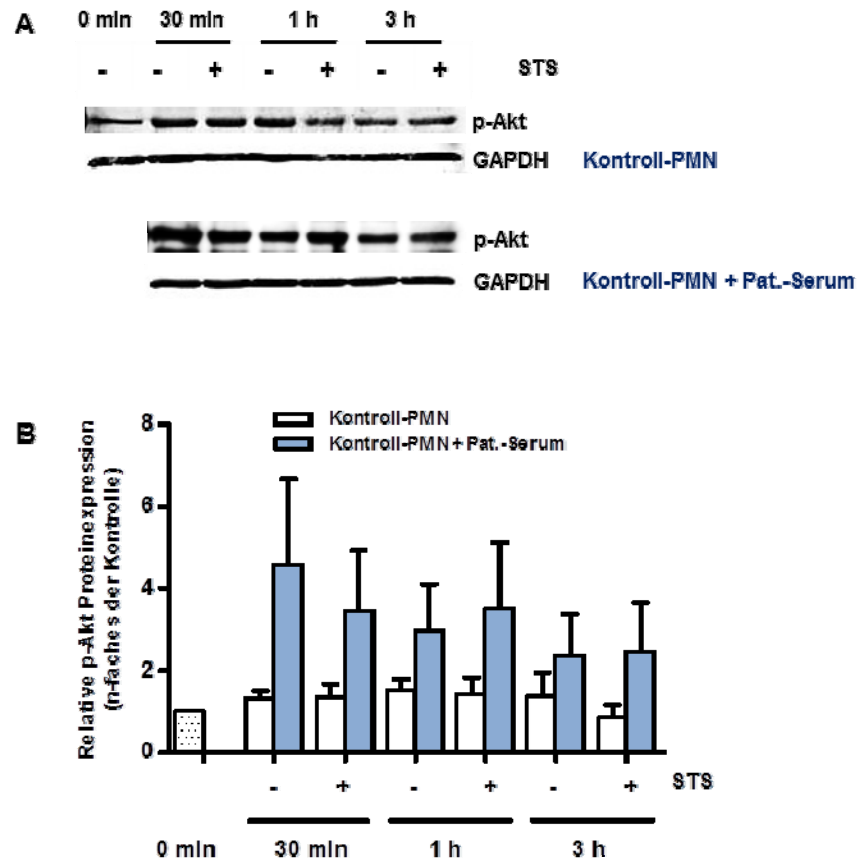


Abbildung 4.11. Effekt von Staurosporin (STS) auf die phospho-Akt-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).

A – Repräsentative Western Blot-Aufnahmen; **B** – Densitometrische Auswertungen der phospho-Akt-Proteinexpression. Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden wurden mit 1 % Serum von Polytrauma-Patienten für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen für weitere 30 min, 1 h und 3 h STS (0,2 µM) zugegeben. Nach den drei Zeitpunkten wurde mittels Western Blot Technik die Proteinexpression der phosphorylierten Akt-Form analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die phospho-Akt-Proteinexpression wurden anschließend mit der basalen Expression von phospho-Akt (frisch isolierte Zellen ohne Kultivierung, als 0 h dargestellt) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-fache der Kontrolle) dargestellt. n = 4.

Nach 1 h und 3 h Inkubation der Kontroll-PMN mit STS wurde eine leichte, nicht signifikante Abnahme der phosphorylierten Isoform GSK-3α (Serin 21) (Abb. 4.12A, B), sowie nach 30 min, 1 h und 3 h Inkubation eine leichte, nicht signifikante Abnahme der phosphorylierten Isoform GSK-3β (Serin 9) beobachtet (Abb. 4.13A, B), die jedoch inaktiven Isoformen dieser Kinase entsprechen. Das Patienten-Serum konnte dagegen die STS-induzierte Abnahme von phosphorylierten inaktiven GSK-3α und GSK-3β zu diesen Zeitpunkten aufheben. Somit lässt sich sagen, dass das Serum polytraumatisierter Patienten sowie der Induktor für intrinsische Apoptose STS den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivität der Kinasen Akt und GSK-3 modulieren können. Dadurch könnte der stabilisierende Effekt des Patienten-Serums auf die Protei-

nexpression von Mcl-1 sowie auf die Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma vermittelt werden.

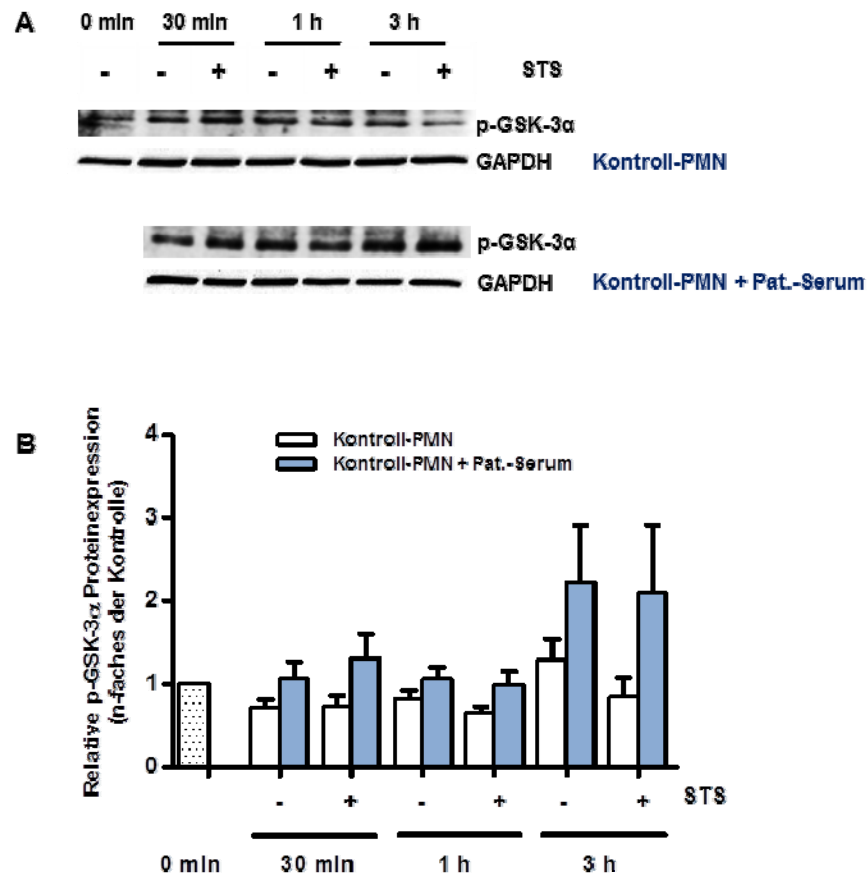


Abbildung 4.12. Effekt von Staurosporin (STS) auf die phospho-GSK-3α-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).

A – Repräsentative Western Blot-Aufnahmen; **B** – Densitometrische Auswertungen der phospho-GSK-3α-Proteinexpression. Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden wurden mit 1 % Serum von Polytrauma-Patienten für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen für weitere 30 min, 1 h und 3 h STS (0,2 µM) zugegeben. Nach den drei Zeitpunkten wurde die Proteinexpression von p-GSK-3α analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die p-GSK-3α-Proteinexpression wurden anschließend mit der basalen Expression der phosphorylierten GSK-3α-Form (frisch isolierte PMN ohne Kultivierung, als 0 h dargestellt) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. n = 6.

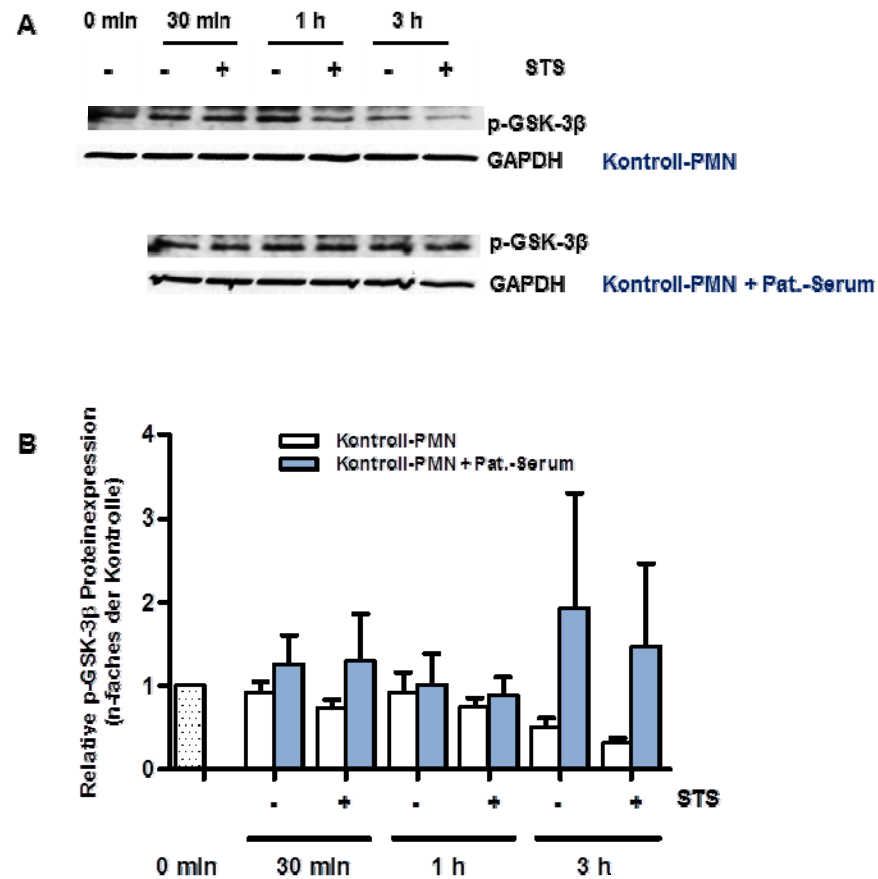


Abbildung 4.13. Effekt von Staurosporin (STS) auf das phospho-GSK-3 β -Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).

A – Repräsentative Western Blot-Aufnahmen; **B** - Densitometrische Auswertungen der Proteinexpression. Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden wurden mit 1 % Serum von Polytrauma-Patienten für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde zu den Zellen für weitere 30 min, 1 h und 3 h STS (0,2 μ M) zugegeben. Nach den drei Zeitpunkten wurde die Proteinexpression von p-GSK-3 β analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die p-GSK-3 β -Proteinexpression wurden anschließend mit der basalen Expression der phosphorylierten GSK-3 β -Form (frisch isolierte PMN ohne Kultivierung, als 0 h dargestellt) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. n = 6.

4.5 Ausschaltung der Mcl-1-Proteinexpression erhöht die Sensitivität der PMN aus Polytrauma-Patienten für Staurosporin

Aus vorherigen Versuchen ist ersichtlich, dass die gestörte PMN-Apoptose nach einem schweren Trauma mit der Resistenz gegen STS sowie mit der erhöhten Proteinexpression von Mcl-1 korreliert. Dies bestätigt die Hypothese, dass der zelluläre Expressionslevel von Mcl-1 in der Regulation der PMN-Apoptose entscheidend ist. Um die Relevanz des Mcl-1-Proteins für die Apoptoseresistenz gegen STS in PMN aus Polytrauma-Patienten zu untersuchen, wurde die Expression dieses Proteins mittels RNAi spezifisch ausgeschaltet. Dazu wurden spezifische gegen Mcl-1-mRNA gerichtete siRNA-

Sequenzen verwendet, die letztendlich den Abbau von Mcl-1-mRNA bewirken. Dies resultiert in der Herunterregulation des Mcl-1-Proteins, im sog. *knock down*.

Die Transfektionsexperimente wurden zuerst mit der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 durchgeführt, die mithilfe von all-trans-Retinolsäure (ATRA) zu Neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden kann und als Modell für humane PMN dient. Zur Ausbildung der STS-Resistenz wurden ausdifferenzierte HL-60 Zellen 2 h vor der Transfektion sowie weitere 24 h nach der Transfektion im Zellkulturmedium mit Serum von Polytrauma-Patienten inkubiert (RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % Patienten-Serum). Nach der Vorinkubation mit dem Patienten-Serum wurden HL-60 Zellen mit siRNA transfiziert. Nachfolgend wurden die transfizierten Zellen für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Transfektionsexperimente wurden parallel auch in PMN aus Polytrauma-Patienten durchgeführt. Die frisch isolierten Patienten-PMN wurden in RPMI-1640 + 1 % P/S + 10 % FCS aufgenommen, 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit siRNA transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert.

HL-60 Zellen und Patienten-PMN wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mcl-1-siRNA (0,5, 1,5 und 2,5 µg) und mit Kontroll-siRNA (20 µM, 0,31 µg/µl) als Positivkontrolle transfiziert. Nach 24 h wurde die Effizienz der Herunterregulation von Mcl-1-Protein mittels Western Blot Analyse überprüft. Die Kontroll-siRNA ist an das Fluoreszenzmolekül AlexaFluor 488 gekoppelt und wurde verwendet, um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde 1 h nach der Transfektion der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (FL-1 *shift*). Der prozentuale Anteil an transfizierten Zellen betrug durchschnittlich ≥ 98 %.

Die Transfektion mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Mcl-1-siRNA führte zu einer signifikanten Herabregulation der Mcl-1-Proteinexpression bis auf 68 % in HL-60 Zellen (Abb. 4.14A) und bis auf ca. 50 % in PMN aus Polytrauma-Patienten (Abb. 4.15A). Um den Einfluss des Mcl-1-*knock downs* auf die intrinsische Apoptoresistenz gegen STS zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen nach 24 h mit 0,2 µM STS für weitere 18 h behandelt. Anschließend wurde die Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transfektion mit 1,5 µg siRNA und die anschließende Behandlung mit STS führte zu der Erhöhung der Apoptoserate in HL-60 Zellen und somit zu der Erhöhung der Sensitivität dieser Zellen für STS (Abb. 4.14B). In PMN aus Polytrauma-Patienten ließ die Transfektion mit 1,5 µg siRNA und die anschließende Behandlung mit STS die gleichen Ergebnisse erzielen. Es kam dabei zu einer signifikanten

Erhöhung der Apoptoserate (Abb. 4.15B). Somit konnte die Sensitivität dieser Zellen für STS deutlich erhöht werden und die intrinsische Apoptoseresistenz, zumindest partiell, aufgehoben werden. Demnach deuten diese Ergebnisse auf eine beachtliche Rolle von Mcl-1 für die intrinsische Apoptoseresistenz gegen STS in PMN aus Polytraumapatienten hin.

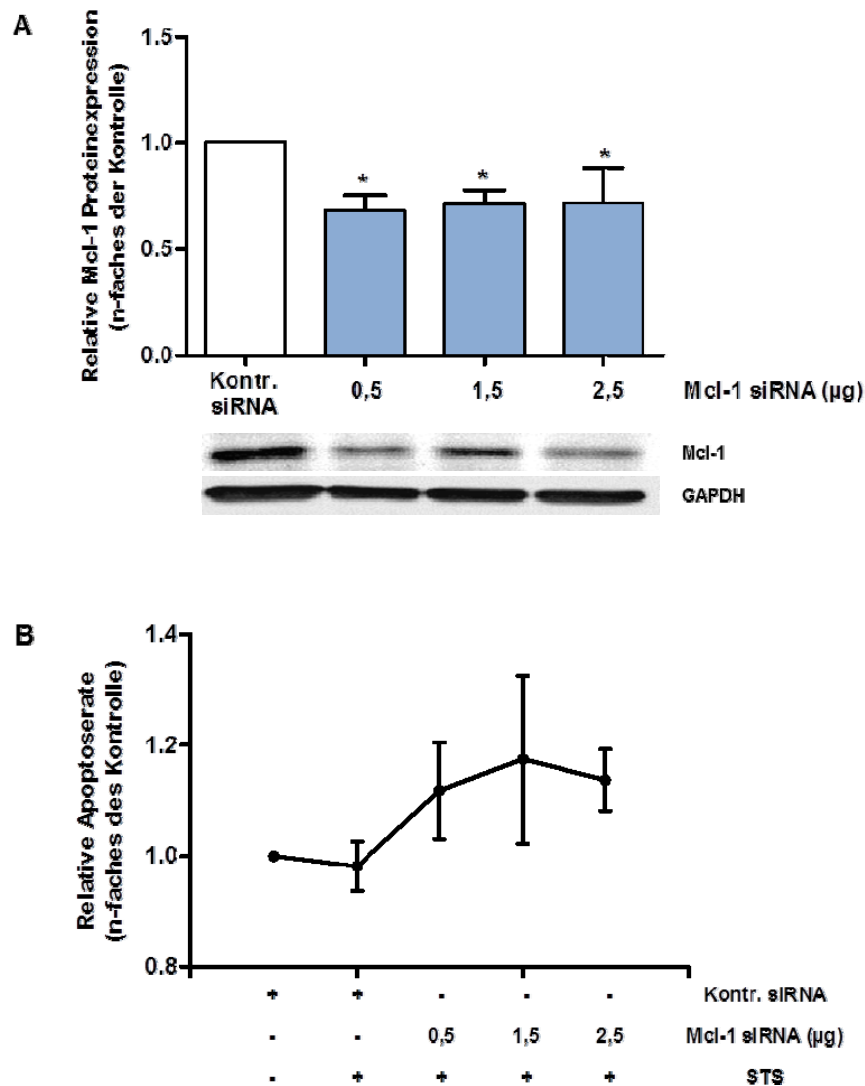


Abbildung 4.14. STS-Resistenz in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen nach spezifischer Ausschaltung des Mcl-1-Proteins mittels siRNA.

Ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden 2 h vor der Transfektion im Zellkulturmedium mit 10 % Patienten-Serum bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mcl-1-siRNA (0,5, 1,5 und 2,5 µg) transfiziert. Als Kontrolle wurde Kontroll-siRNA, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488, verwendet. **A** - 24 h nach der Transfektion wurde die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Technik analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression für jede Mcl-1-siRNA Konzentration wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der Kontrolle (Transfektion mit der Kontroll-siRNA für 24 h) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. Abgebildet sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. **B** - 24 h nach der Transfektion wurde zu den HL-60 Zellen STS (0,2 µM) für weitere 18 h zugegeben. Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es wurde der prozentuale Anteil der Zellen gemessen, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. Die Daten sind als relative Apoptoserate (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit der Kontroll-siRNA für 24 h). n = 4.

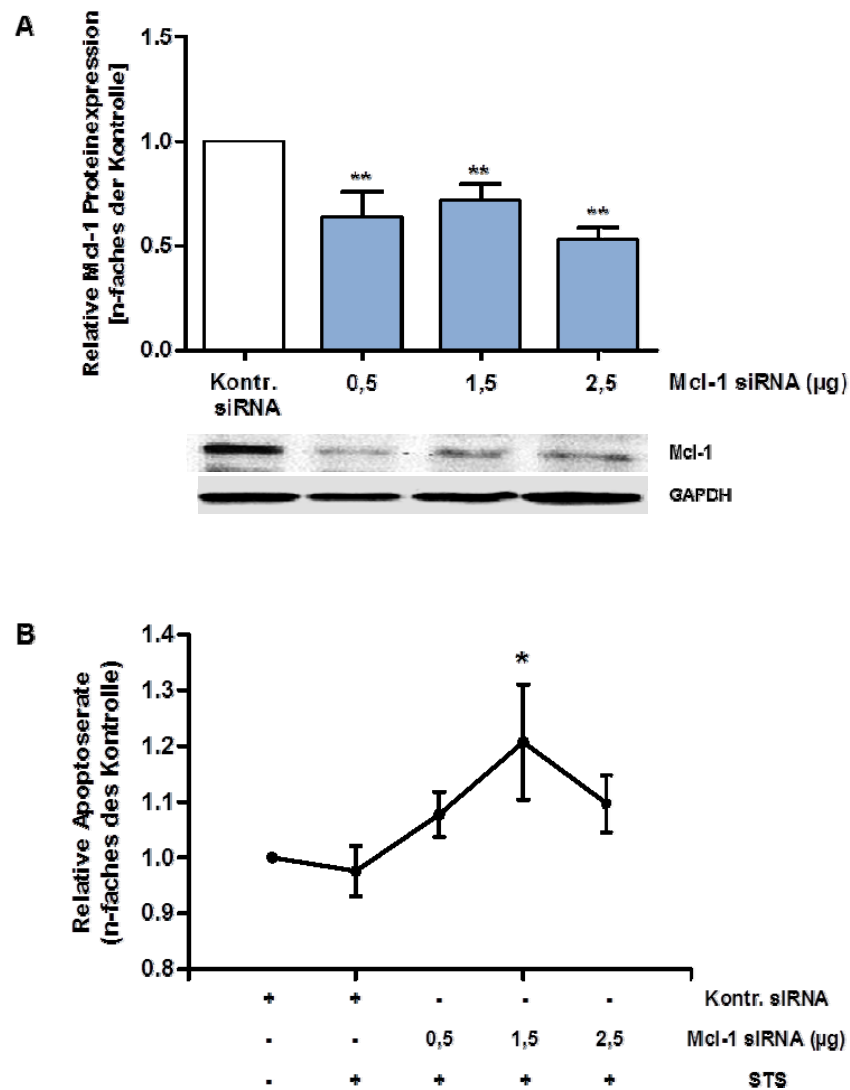


Abbildung 4.15. STS-Resistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten nach spezifischer Ausschaltung des Mcl-1-Proteins mittels siRNA.

Frisch isolierte Patienten-PMN wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mcl-1-siRNA (0,5, 1,5 und 2,5 µg) transfiziert. Als Kontrolle wurde Kontroll-siRNA, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488, verwendet. **A** – 24 h nach der Transfektion wurde die Proteinexpression von Mcl-1 mittels Western Blot Technik analysiert und auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH normiert. Die Daten für die Mcl-1-Proteinexpression für jede Mcl-1-siRNA Konzentration wurden anschließend mit der Mcl-1-Proteinexpression in der Kontrolle (Transfektion mit der Kontroll-siRNA für 24 h) verglichen. Die Daten sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. Abgebildet sind densitometrische Auswertungen der Mcl-1-Proteinexpression mit repräsentativen Western Blot-Aufnahmen. ** < 0,005 im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit der Kontroll-siRNA für 24 h). n ≥ 6. **B** – 24 h nach der Transfektion wurde zu den Zellen STS (0,2 µM) für weitere 18 h zugegeben. Nach 18 h erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptose. Es wurde der prozentuale Anteil der Zellen gemessen, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. Die Daten sind als relative Apoptoserate (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05 im Vergleich zur STS-Kontrolle (Transfektion mit der Kontroll-siRNA + STS). n ≥ 6.

4.6 Mcl-1 interagiert verstärkt mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie in PMN aus Polytrauma-Patienten

Entscheidend für die Regulation der Apoptose ist das zelluläre Verhältnis sowie die Interaktionen zwischen den pro- und antiapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie (Oltvai et al. 1993; Westphal et al. 2011). Um zu untersuchen, mit welchen proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie Mcl-1 in humanen PMN interagiert und dadurch seine antiapoptotische Funktion ausübt, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Die Experimente wurden in frisch isolierten PMN aus Polytrauma-Patienten durchgeführt. Zur Kontrolle wurden frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden genommen.

In den Mcl-1-präzipitierten Proben aus Kontroll- und Patienten-PMN konnten Signale für Bax, Bid, Bad, Bik, zusätzlich mit Bim und Puma (nicht gezeigt), detektiert werden. Eine leicht erhöhte Heterodimerisierung von Mcl-1 mit vier untersuchten proapoptotischen Proteinen (Bax, Bid, Bad und Bik) wurde in PMN aus Polytrauma-Patienten, im Vergleich zu PMN gesunder Probanden, beobachtet (Abb. 4.16A). Die Interaktion von Mcl-1 mit Bax wurde mittels einer reziproken Co-Immunpräzipitation für das Protein Bax bestätigt (Abb. 4.16B).

Dies bekräftigt die Hypothese, dass Mcl-1 in PMN aus Polytrauma-Patienten an der Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz, vermutlich durch eine verstärkte Interaktion mit proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, beteiligt ist.

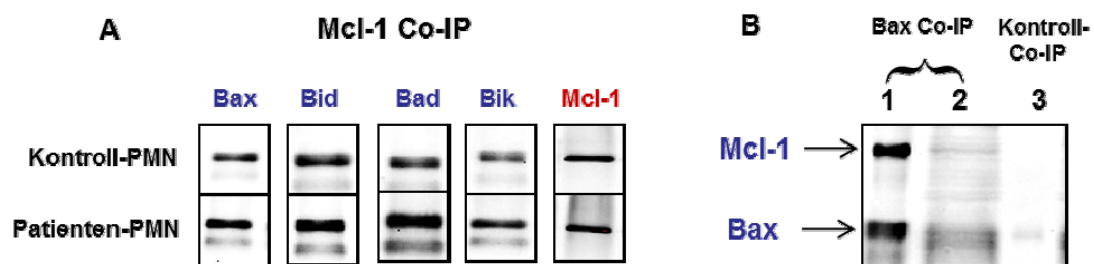


Abbildung 4.16. A - Co-Immunpräzipitation (Co-IP) von Bax, Bid, Bad und Bik mit Mcl-1 in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN). B - Die reziproke Co-IP von Mcl-1 mit Bax in PMN aus gesunden Probanden.

A - Aus den Gesamtprotein-Lysaten von frisch isolierten PMN gesunder Probanden sowie der Polytrauma-Patienten wurde mit dem spezifischen Antikörper (monoklonal aus Maus, BD Pharmingen) das Protein Mcl-1 präzipitiert. Die Expression der potentiellen Mcl-1-Interaktionspartner Bax, Bid, Bad und Bik wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Membranen gestrippt und mit dem Antikörper gegen das Mcl-1-Protein reinkubiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Aufnahmen von 6 unabhängigen Experimenten. **B** - Aus den Gesamtprotein-Lysaten von frisch isolierten Kontroll-PMN wurde mit dem spezifischen Antikörper (polyklonal aus Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology) das Protein Bax präzipitiert. Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression von Mcl-1 analysiert. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Membranen gestrippt und mit dem Antikörper gegen das Bax-Protein reinkubiert. **1** - an die Beads gebundene Fraktion; **2** - nicht gebundene Fraktion; **3** - Kontroll Co-IP mit den leeren Beads (hier wird an die leeren Beads gebundene Fraktion gezeigt). Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Aufnahmen von zwei unabhängigen Experimenten.

4.7 Die verminderte Spaltung und mitochondriale Translokation von Bax und Bid korreliert mit der Hemmung der Freisetzung von Cytochrom *c* in PMN aus Polytrauma-Patienten

Durch die Heterodimerisierung von Mcl-1 mit den proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bax oder Bid, können diese in ihrer proapoptotischen Funktion gehemmt werden und bleiben im Zytosol inaktiv. Aus den Komplexen befreit, werden diese Proteine oligomerisiert und sind an den Mitochondrien für die MOMP verantwortlich, was in humanen PMN ein Merkmal der frühen Apoptose ist (Maiani et al. 2004). Die vorherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nach der Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges mittels anti-Fas IgM Antikörper in PMN aus gesunden Probanden sowie in PMN aus Polytrauma-Patienten zu der Abnahme des MMP, der Abnahme des zellulären Proteinlevels von Mcl-1 sowie der Erhöhung der Apoptose kommt. Nach der Einleitung des intrinsischen Apoptosesignalweges mit STS bleiben dagegen PMN aus Polytrauma-Patienten, im Vergleich zu PMN gesunder Probanden, apoptoseresistent, was mit der Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels korreliert.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Abbau bzw. die Stabilisierung des Mcl-1-Proteins auf die Aktivität und Lokalisation von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie hat, wurde eine mögliche Translokation dieser Faktoren zu den Mitochondrien nach der Einleitung des extrinsischen sowie des intrinsischen Apoptosesignalwege untersucht. Dazu wurden frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden sowie aus Polytrauma-Patienten in RPMI-1640 + 1 % P/S + 5 % FCS mit der Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in die Vertiefungen einer 12-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit STS (0,2 μ M) bzw. mit anti-Fas IgM Antikörper (200 ng/ml) für 18 h inkubiert und anschließend die Zellfraktionierung mittels Homogenisierung durchgeführt. Es wurden die zytosolische und die mitochondriale Fraktionen gewonnen und die Proteine aus den beiden Fraktionen in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Mittels Western Blot Analyse wurde dann die Proteinexpression von Bax, Bid und Cytochrom *c* in beiden Fraktionen untersucht.

Nach 18 h Inkubation wurde das Protein Bax in Kontroll- und in Patienten-PMN überwiegend in der zytosolischen Fraktion, und in kleineren Mengen auch in der mitochondrialen Fraktion detektiert. Neben dem Signal für das volle Bax (20 kDa) wurde auch die kurze, gesplante Form dieses Proteins (*truncated* Bax, tBax) mit einem Molekulargewicht von 18 kDa in der mitochondrialen Fraktion in beiden Zellgruppen detektiert (Abb. 4.17).

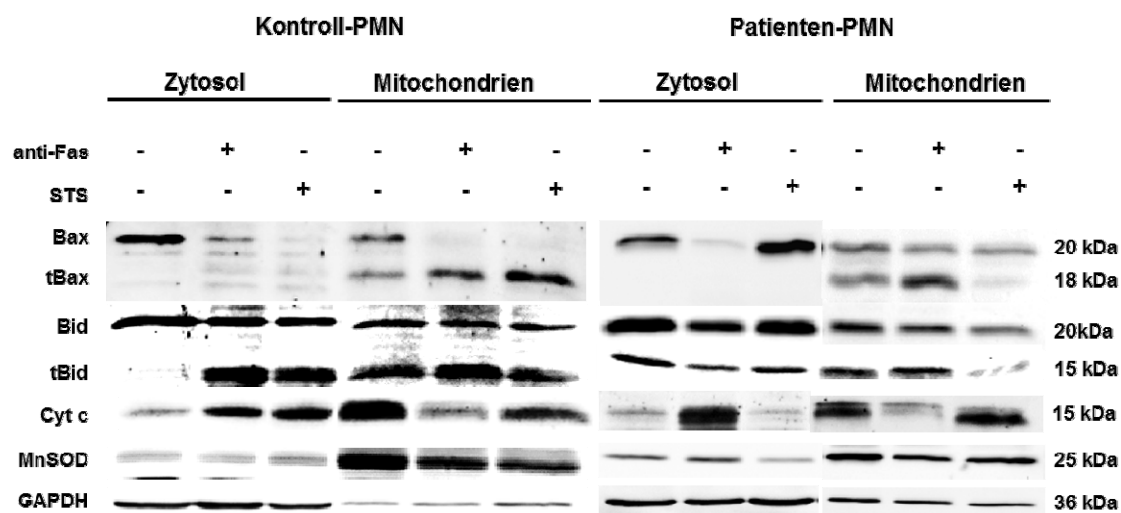


Abbildung 4.17. Subzelluläre Lokalisation von Bax, Bid und Cytochrom *c* (Cyt *c*) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).

Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten wurden für 18 h mit dem anti-Fas IgM (200 ng/ml) bzw. STS (0,2 μ M) inkubiert und anschließend die Zellfraktionierung durchgeführt. In den gewonnenen zytosolischen und mitochondrialen Fraktionen wurde die Proteinexpression von Bax, Bid und Cyt *c* mittels Western Blot Technik analysiert. Die Immunfärbung mit den Antikörpern gegen GAPDH und MnSOD diente hier als Referenz zu den zytosolischen bzw. mitochondrialen Fraktionen. Es sind die repräsentativen Western Blot-Aufnahmen von ≥ 5 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Somit fanden in Kontroll- und Patienten-PMN während der spontanen Apoptose nach 18 h die Translokation von Bax zu den Mitochondrien sowie die Spaltung und die Translokation von tBax zu den Mitochondrien statt. Das Signal für tBax wurde hauptsächlich in den mitochondrialen Fraktionen dokumentiert. Aus diesem Grund wurde das volle Protein Bax für die Quantifizierung der Expression in den zytosolischen Fraktionen, und die gespaltene tBax-Form für die Quantifizierung der Expression in den mitochondrialen Fraktionen in beiden Zellgruppen genommen.

Nach 18 h Inkubation der Kontroll-PMN mit den Apoptose-induzierenden Substanzen, wie STS bzw. anti-Fas IgM, wurde überwiegend die Translokation von tBax zu den Mitochondrien beobachtet. Es kam zu einer bis zu ca. 3-fachen signifikanten Abnahme des Bax-Proteinlevels in der zytosolischen Fraktion, sowie zu einer bis zu ca. 3-fachen jedoch nicht signifikanten Erhöhung des tBax-Proteinlevels in der mitochondrialen Fraktion, im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Abb. 4.18A-B). Generell wurde ein schwaches oder kein Signal für Bax in der vollen Form in beiden Fraktionen während der induzierten Apoptose mit STS und anti-Fas IgM in Kontroll-PMN detektiert.

Die Inkubation der Patienten-PMN mit dem anti-Fas IgM für 18 h bewirkte eine Spaltung sowie mitochondriale Translokation von Bax (Abb. 4.17). Es wurden erhöhte

Mengen an tBax ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion dokumentiert. Gleichzeitig kam es zu einer 6,5-fachen signifikanten Abnahme des Bax-Proteinlevels in der zytosolischen Fraktion und zu einer ca. 1,3-fachen Erhöhung des tBax-Proteinlevels in der mitochondrialen Fraktion, im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Abb. 4.18C-D).

Im Gegensatz dazu blieb die Spaltung von Bax nach der Behandlung der Patienten-PMN mit STS aus, die mitochondriale Translokation von Bax war deutlich vermindert. Der Proteinlevel von Bax war ca. 1,8-fach signifikant erhöht im Zytosol während der STS-induzierten Apoptose, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Dies korrelierte mit einer 2,3-fachen signifikanten Abnahme der Bax-Spaltung in der mitochondrialen Fraktion in diesen Zellen (Abb. 4.18C-D).

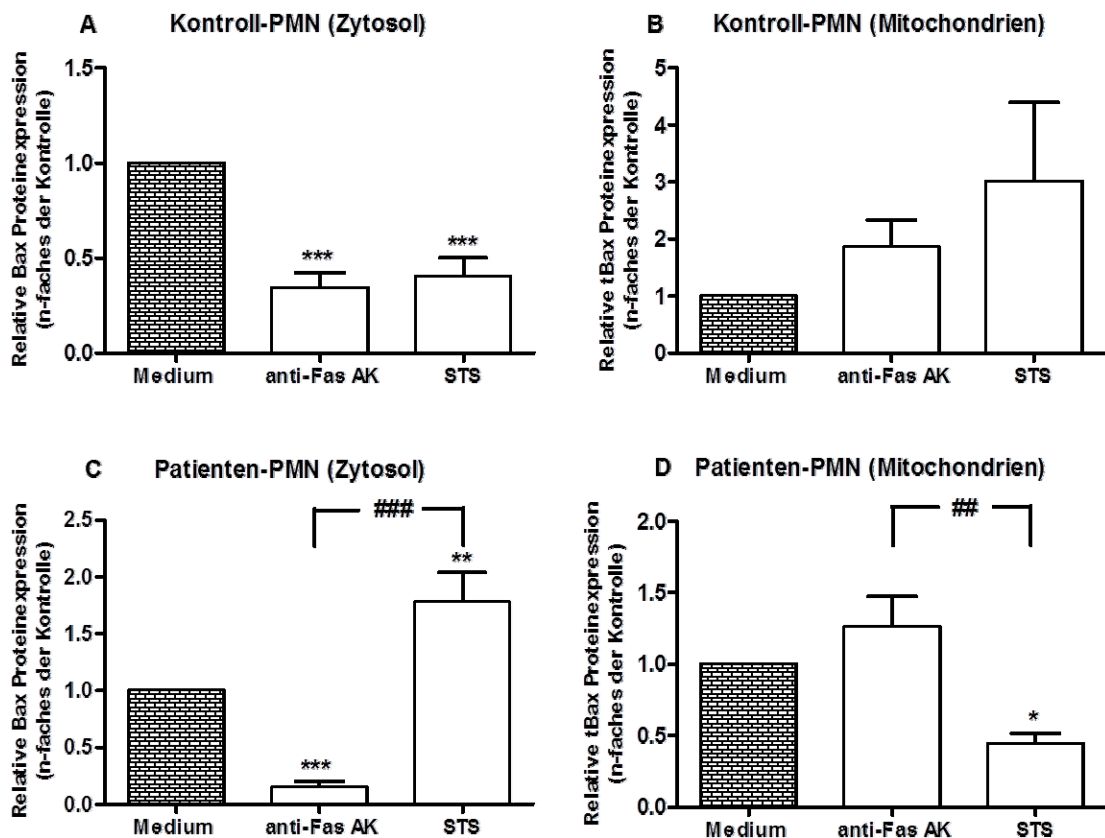


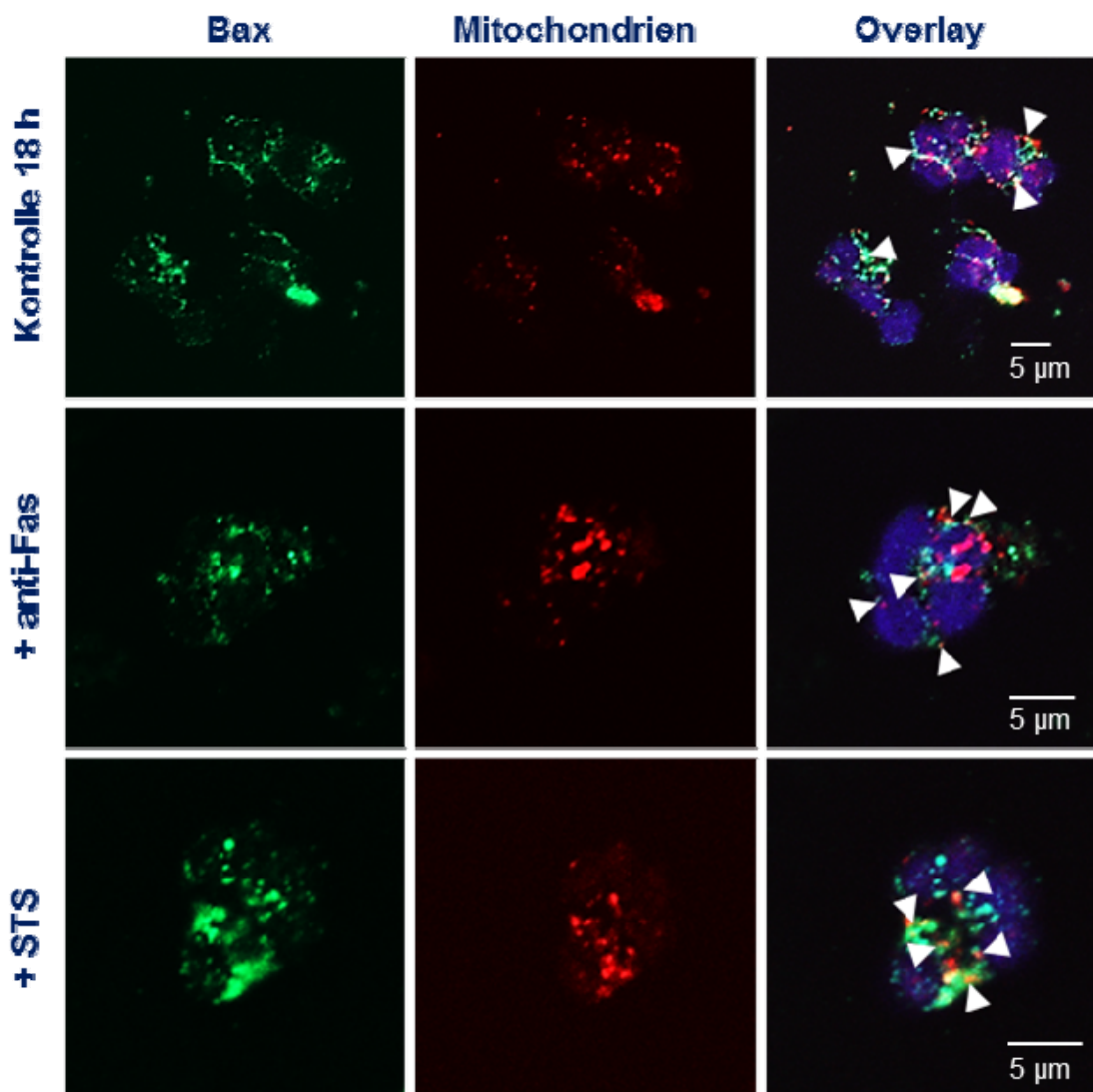
Abbildung 4.18. Densitometrische Auswertungen der Bax/tBax-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A, B - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (C, D - Patienten-PMN).

Die Proteinexpression von Bax in den zytosolischen Fraktionen wurde auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH, die Proteinexpression von tBax in den mitochondrialen Fraktionen - auf die Proteinexpression des Referenzgens MnSOD normiert. Die Daten für die Bax/tBax-Proteinexpression wurden anschließend mit der Proteinexpression in der jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Zellen, 18 h) verglichen und sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05, ** < 0,005, *** < 0,0005 im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; ## < 0,005, ### < 0,0005. n ≥ 5.

Die Translokation von Bax zu den Mitochondrien nach Einleitung des intrinsischen und des extrinsischen Apoptosesignalwege mittels STS bzw. anti-Fas IgM Anti-

körper wurde zusätzlich in Kontroll- und in Patienten-PMN mittels Immunfluoreszenz verifiziert (Abb. 4.19). Dazu wurden Kontroll- und Patienten-PMN auf die mit Poly-D-Lysin vorbeschichteten Deckgläschen immobilisiert und anschließend für 18 h mit STS bzw. mit dem anti-Fas IgM inkubiert.

A Kontroll-PMN



Legende und Abb. 4.19B – s. nächste Seite

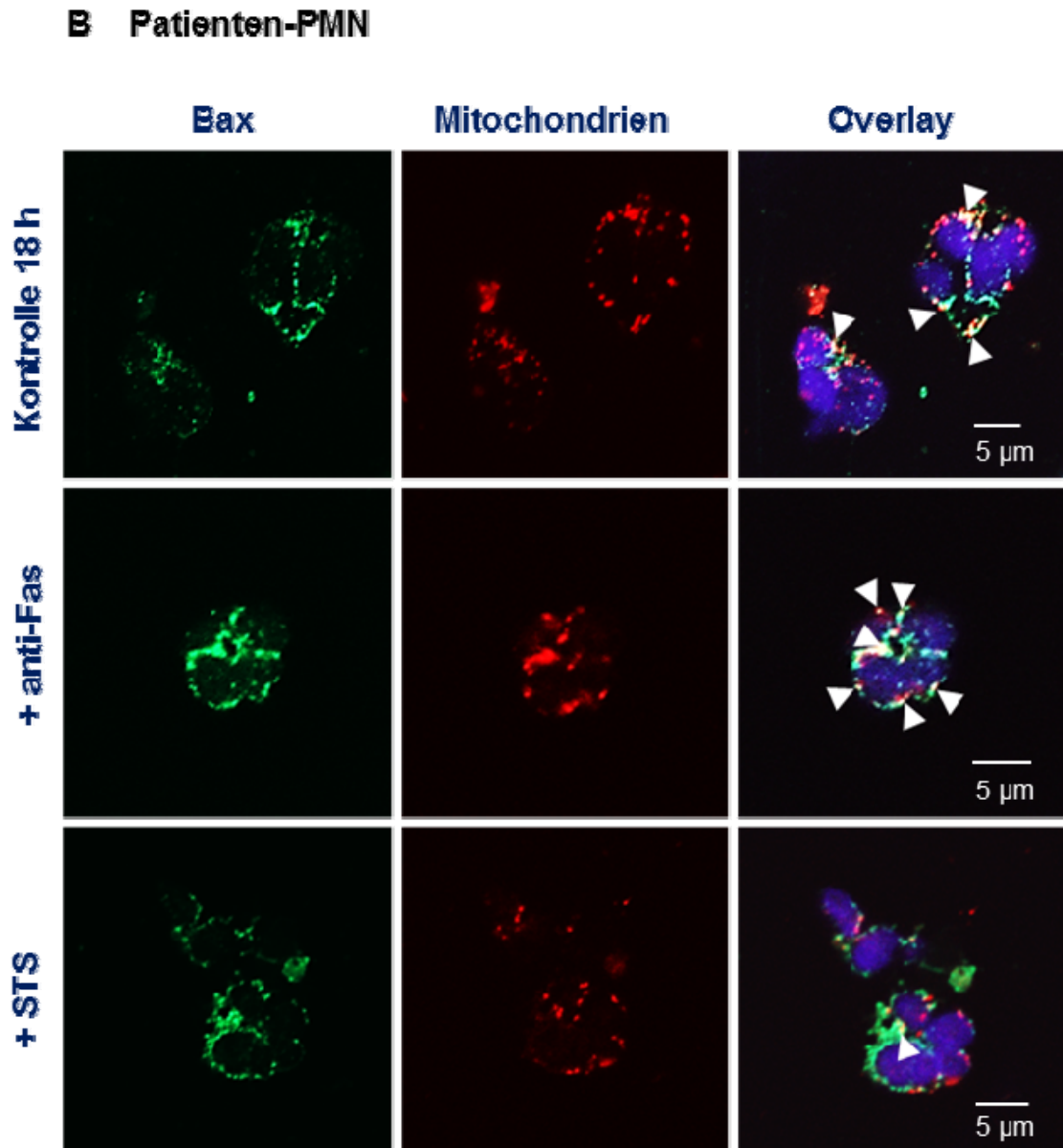


Abbildung 4.19. Subzelluläre Lokalisation von Bax in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und in PMN aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).

A – Staurosporin (STS) und anti-Fas IgM Antikörper stimulieren die mitochondriale Translokation von Bax in Kontroll-PMN. **B** – In Patienten-PMN bewirkt der anti-Fas IgM, und nicht STS, die mitochondriale Translokation von Bax. Frisch isolierte PMN aus gesunden Probanden sowie aus Polytrauma-Patienten wurden auf die mit Poly-D-Lysin vorbeschichteten Deckgläschen immobilisiert und anschließend für 18 h mit STS (0,2 µM) bzw. anti-Fas IgM (200 ng/ml) inkubiert. Die Analyse der Translokation von Bax (grün) zu den Mitochondrien (rot) erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie. Die Kolokalisation von Bax mit den Mitochondrien ist als gelb-orange Fluoreszenz zu sehen (Pfeilspitzen). Dargestellt sind die repräsentativen Mikrofotografien von zwei unabhängigen Experimenten.

Nach 18 h Inkubation der Kontroll- und Patienten-PMN wurde eine zytosolische (grünes Signal) sowie auch eine teilweise mitochondriale Lokalisation (im Overlay gelb-oranges Signal) von Bax beobachtet. Die Aktivierung des extrinsischen Apoptose-signalweges mit dem anti-Fas IgM in Kontroll- und in Patienten-PMN resultierte in einer deutlichen Zunahme der Gelbfluoreszenz, im Vergleich zu den jeweiligen unbe-

handelten Kontrollen, was der verstärkten mitochondrialen Lokalisation von Bax entsprach (Abb. 4.19A, B).

STS bewirkte dagegen die mitochondriale Lokalisation von Bax nur in den Kontroll-PMN, wo ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Gelbfluoreszenz detektiert wurde (Abb. 4.19A). In Patienten-PMN war eine pyknotische grüne Färbung von Bax nach der Behandlung mit STS dokumentiert, was der zytosolischen Lokalisation von diesem Protein entsprach. Das Protein Bax blieb in Patienten-PMN nach der Einleitung des intrinsischen Apoptosesignalweges mit STS größtenteils im Zytosol und wurde nicht zu den Mitochondrien transloziert (Abb. 4.19B).

Die kurze, gespaltene Bid-Form (*truncated* Bid, tBid) von 15 kDa, konnte im Vergleich zu tBax, in beiden Fraktionen, jedoch nur in den Proben einzelner Spender (sowohl in Kontroll- als auch in Patienten-PMN) detektiert werden. Daher erfolgte die Quantifizierung der Expression sowohl in den zytosolischen als auch in den mitochondrialen Fraktionen ausschließlich für das volle Protein Bid von 20 kDa. Während der spontanen Apoptose nach 18 h wurde in Kontroll-PMN das Signal für das Protein Bid, und (vereinzelt) für tBid in beiden Fraktionen detektiert. Somit fanden die Translokation von Bid zu den Mitochondrien, sowie die Spaltung und die Translokation von tBid zu den Mitochondrien statt (Abb. 4.17). Nach 18 h Inkubation der Kontroll-PMN mit STS sowie mit dem anti-Fas IgM kam es zu einer bis zu 2-fachen Abnahme des Bid-Proteinlevels in den zytosolischen Fraktionen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Gleichzeitig wurde eine ca. 1,6-fache Erhöhung des Bid-Proteinlevels in den mitochondrialen Fraktionen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, dokumentiert (Abb. 4.20A). Bid wurde sowohl in der vollen als auch in der aktiven gespaltenen Form (vereinzelt) während der induzierten Apoptose mit STS bzw. anti-Fas IgM in Kontroll-PMN zu den Mitochondrien transloziert.

In PMN aus Polytrauma-Patienten konnte während der spontanen sowie Fas-induzierten Apoptose die Spaltung von Bid zu tBid (ebenfalls vereinzelt), sowie die Translokation beider Formen zu den Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 4.17). Nach der Behandlung der Patienten-PMN mit dem anti-Fas IgM kam es zu einer ca. 2-fachen Abnahme des Bid-Proteinlevels in der zytosolischen Fraktion. Gleichzeitig wurde eine ca. 1,4-fache Erhöhung des Bid-Proteinlevels in der mitochondrialen Fraktion, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, dokumentiert (Abb. 4.20B). Die Einleitung der intrinsischen Apoptose mit STS bewirkte in Patienten-PMN zumindest eine partielle Hemmung der Spaltung und der mitochondrialen Translokation von Bid. Der Proteinlevel von Bid in der mitochondrialen Fraktion war ca. 2-fach erniedrigt während

der STS-induzierten Apoptose, im Vergleich zu dem Bid-Proteinlevel in der mitochondrialen Fraktion während der Fas-induzierten Apoptose in diesen Zellen (Abb. 4.20B). Das Bid-Protein blieb somit nach STS-Behandlung in Patienten-PMN größtenteils im Zytosol (Abb. 4.17).

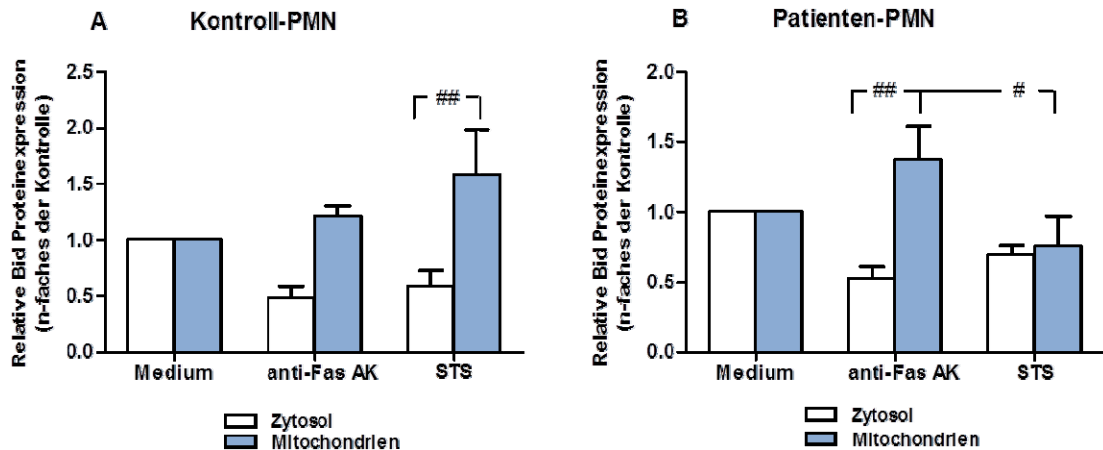


Abbildung 4.20. Densitometrische Auswertungen der Bid-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).

Die Proteinexpression von Bid in den zytosolischen Fraktionen wurde auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH, in den mitochondrialen Fraktionen - auf die Proteinexpression des Referenzgens MnSOD normiert. Die Daten für die Bid-Proteinexpression wurden anschließend mit der Proteinexpression in der jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Zellen, 18 h) verglichen und sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. # < 0,05, ## < 0,005. n ≥ 7.

Die mitochondriale Translokation von proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. Bax und Bid, resultiert in der MOMP in humanen PMN (Maiani, Roos et al. 2004). Dadurch wird die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran zerstört, was den Austritt von proapoptotischen Proteinen, wie z.B. Cytochrom *c*, ins Zytosol bewirkt. Die mitochondriale Translokation von Bax/tBax und Bid/tBid nach der Inkubation der Kontroll-PMN für 18 h mit STS bzw. mit dem anti-Fas IgM korrelierte mit einer bis zu 2,4-fachen signifikanten Erhöhung des Cytochrom *c*-Proteinlevels im Zytosol. Gleichzeitig wurde eine bis zu ca. 2-fache Abnahme dieses Proteins in der mitochondrialen Fraktion, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, dokumentiert (Abb. 4.17, 4.21A).

In PMN aus Polytrauma-Patienten konnte ebenfalls der Austritt von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol nach der Behandlung dieser Zellen für 18 h mit dem anti-Fas IgM detektiert werden (Abb. 4.17). Es kam dabei zu einer ca. 3-fachen Erhöhung des Cytochrom *c*-Proteinlevels in der zytosolischen Fraktion. Dies korrelierte mit einer 1,6-fachen Abnahme dieses Proteins in der mitochondrialen Fraktion, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.21B).

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von Patienten-PMN mit STS zu einer kompletten Aufhebung der Freisetzung von Cytochrom *c* ins Zytosol. Das Signal für Cytochrom *c* konnte in Patienten-PMN nach STS-Behandlung ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion detektiert werden und korrelierte ferner mit der verminderten Spaltung und verminderten mitochondrialen Translokation von Bax und Bid (Abb. 4.17; 4.21B).

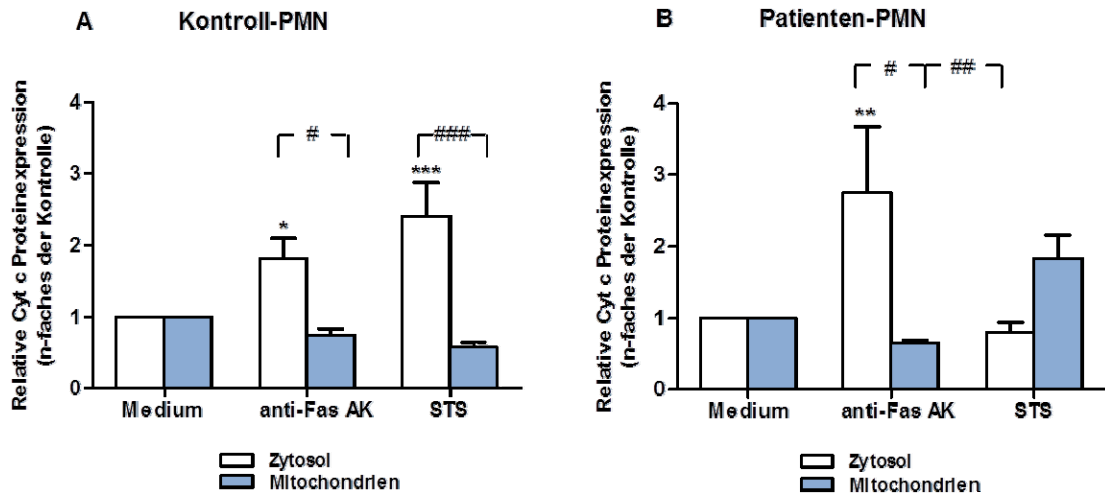


Abbildung 4.21. Densitometrische Auswertungen der Cytochrom *c* (Cyt *c*)- Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).

Die Proteinexpression von Cyt *c* in den zytosolischen Fraktionen wurde auf die Proteinexpression des Referenzgens GAPDH, in den mitochondrialen Fraktionen - auf die Proteinexpression des Referenzgens MnSOD normiert. Die Daten für die Cyt *c*-Proteinexpression wurden anschließend mit der Proteinexpression in der jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Zellen, 18 h) verglichen und sind als relative Proteinexpression (n-faches der Kontrolle) dargestellt. * < 0,05, ** < 0,005, *** < 0,0005 im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; # < 0,05, ## < 0,005, ### < 0,0005. n ≥ 7.

5 Diskussion

Als essentielle Zellen des angeborenen Immunsystems stellen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene im Organismus dar. PMN sind terminal ausdifferenzierte, nicht proliferierende Zellen, die sich aufgrund der spontanen (konstitutiven) Apoptose durch eine extrem kurze Lebensdauer von 8 – 20 h auszeichnen (Edwards 1994). Letztere kann durch zahlreiche Mediatoren, wie z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren (Brach, deVos et al. 1992; Colotta, Re et al. 1992; Martin 1999), aber auch durch andere Agentien, wie Lipopolysaccharide (LPS) (Lee, Whyte et al. 1993) oder Hypoxie (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000), deutlich verlängert werden. Durch Zytokine können PMN außerdem rasch an Ort der Entzündung mobilisiert werden, wo sie effektiv Mikroorganismen und Viren durch Phagozytose, Degranulation, oxidativen Burst (Nathan 2006) sowie durch Freisetzung von extrazellulären Fallen aus Chromatin und Proteinen (*neutrophil extracellular traps*, NETs), sog. NETose (Brinkmann et al. 2004), bekämpfen. Diese Funktionen der PMN sind jedoch unspezifisch und können die Schädigung von gesundem Gewebe sowie eine langanhaltende Entzündung hervorrufen (Duffin et al. 2010).

Die Balance zwischen dem Überleben und dem programmierten Zelltod der PMN ist daher ein grundlegender Mechanismus, der die Funktionalität sowie eine sichere Eliminierung dieser potentiell toxischen Zellen kontrolliert. Die kurze Lebensdauer und die Einleitung der Apoptose in PMN ist für die Zellhomöostase und das Abklingen einer Entzündung essentiell, wogegen eine verlängerte Lebensspanne den PMN die Ausführung von proinflammatorischen und antimikrobiellen Funktionen ermöglicht (Savill et al. 1995).

PMN wurden erstmalig vor ca. 120 Jahren von dem deutschen Arzt und Forscher Paul Ehrlich (1854-1915) und dem russischen Zoologen und Bakteriologen Ilja Iljitsch Metschnikow (1845-1916) beschrieben. Ein besseres Verständnis über die Rolle und die Funktionen der PMN unter physiologischen und pathologischen Bedingungen wurde dennoch erst in den beiden letzten Jahrzehnten erreicht. Heutzutage ist bekannt, dass PMN zahlreiche inflammatorische Mediatoren, wie z.B. die Komponenten des Komplementsystems, Fc-Rezeptoren, Chemokine und Zytokine, exprimieren können (Cassatella 1999). PMN produzieren auch antiinflammatorische Faktoren, wie z.B. Interleukin 10 (IL-10) oder Transformierender Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor* β , TGF- β), die für das Abklingen einer Entzündung essentiell sind (Cowburn, Condliffe et al. 2008). Außerdem sind PMN in die Aktivierung und Regulation der Zel-

len des adaptiven und des angeborenen Immunsystems involviert und stellen somit das Schlüsselement des adaptiven und des angeborenen Immunsystems dar (Nathan 2006; Mantovani, Cassatella et al. 2011). Dementsprechend spielen PMN eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von einer Vielzahl an Erkrankungen, wie z.B. Krebserkrankungen, chronische Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen, was das besondere Interesse für diese Zellen in der Forschung erklärt.

Nach einem schweren Trauma wird häufig die Erhöhung der Funktionalität (Maekawa, Futami et al. 1998; Seidelin, Nielsen et al. 2002) sowie die Verlängerung der Lebensspanne der PMN beobachtet (Jimenez, Watson et al. 1997; Maiani, Maiani et al. 2004; Taneja, Parodo et al. 2004). Die verlängerte Lebensspanne wird durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), sowie durch Zytokine und Chemokine, wie z.B. IL-1 β , IL-8 und IL-18, vermittelt (Ertel et al. 1998; Akgul, Moulding et al. 2001; Mayadas et al. 2005; Hewins et al. 2006), die in erhöhten Konzentrationen im Serum von schwerverletzten Patienten vorzufinden sind (Ayala, Perrin et al. 1990; Tanaka, Ishikawa et al. 1996; Coxon, Tang et al. 1999; Dinarello 2000; Grobmyer et al. 2000; Oberholzer et al. 2001). Die verzögerte spontane Apoptose in PMN nach einem schweren Trauma ist außerdem auf eine gestörte intrinsische Apoptose zurückzuführen und korreliert mit der erhöhten Expression vom antiapoptotischen Protein *myeloid-cell leukemia 1* (Mcl-1). Die Vorinkubation der PMN gesunder Probanden mit dem Serum von Polytrauma-Patienten führt zu einer verzögerten spontanen sowie induzierten intrinsischen Apoptose in diesen Zellen. Es wurde die Stabilisierung des Mcl-1-Proteins, die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und die verzögerte Apoptose nach der Behandlung dieser Zellen mit dem Induktor für intrinsische Apoptose Staurosporin (STS) beobachtet (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Dieser Effekt lässt sich ebenfalls in der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie HL-60 reproduzieren (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe).

Die intrazellulären Signalwege, die die Serum-vermittelte Verzögerung der PMN-Apoptose bewirken, sind bis heute nicht ausreichend erforscht worden. Im Fokus dieser Arbeit stand daher die Aufklärung von molekularen Mechanismen, die den Serum-mediierten Effekt auf die verzögerte spontane und induzierte intrinsische Apoptose sowie auf die erhöhte Expression vom Protein Mcl-1 in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln.

Die membranständigen Rezeptoren sowie die Kinasen, die die Phosphorylierung von Tyrosin, Serin und Threonin bewirken, sind für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen und somit für die Regulation der PMN-Apoptose essentiell (Akgul, Moulding et al. 2001). Mehrere intrazellulären Signalwege, u.a. Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) sowie die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), werden in der Literatur als mögliche Faktoren erwähnt, die an der Zytokin-medierten Verzögerung der PMN-Apoptose beteiligt sein können (Frasch, Nick et al. 1998; Aoshiba, Yasui et al. 1999; Klein et al. 2000). In Anlehnung an die Ergebnisse der Vorversuche für diese Arbeit sowie an aktuelle Literatur wurde somit als Erstes die Rolle der Kinasen PI3K/Akt und p38 für die PMN-Apoptose untersucht. Außerdem wurde analysiert, ob diese Kinasen den Serum-medierten antiapoptotischen Effekt und die Serum-induzierte Stabilisierung von Mcl-1 in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln.

Die Rolle der MAP Kinase p38 in der PMN-Apoptose wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert und bleibt bis heute unklar. Häufig wird p38 in humanen PMN als antiapoptotisch beschrieben (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000; Villunger et al. 2000; Alvarado-Kristensson, Porn-Ares et al. 2002), wobei manche Autoren eine proapoptotische Rolle für p38 postulieren (Frasch, Nick et al. 1998; Aoshiba, Yasui et al. 1999; Derouet, Thomas et al. 2006; Geering, Gurzeler et al. 2011). Es bleibt außerdem umstritten, ob GM-CSF die Phosphorylierung und die Aktivierung von p38 beeinflussen kann. Nijhuis *et al.* beschreiben die GM-CSF-medierte Phosphorylierung von p38 (Nijhuis et al. 2002), die in der Phosphorylierung und Inaktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 resultiert (Alvarado-Kristensson et al. 2004). Suzuki *et al.* und Derouet *et al.* berichten hingegen, dass p38 durch GM-CSF nur sehr schwach bzw. mit zeitlicher Verzögerung aktiviert werden kann (Suzuki et al. 1999; Derouet, Thomas et al. 2004). Andere Arbeitsgruppen postulieren, dass GM-CSF keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und Aktivierung von p38 hat (Aoshiba, Yasui et al. 1999; Villunger, O'Reilly et al. 2000).

PI3K/Akt ist in humanen PMN neben MEK1/ERK der wichtigste antiapoptotische Signalweg. Die aktive PI3K kann über ihre Produkte, PIP3 und PIP2 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und -3,4-biphosphat), die Phosphorylierung am Threonin 308 und die Rekrutierung von Akt vom Zytosol zur Plasmamembran bewirken (Franke et al. 1997; Frech et al. 1997; Marte et al. 1997). GM-CSF gilt als einer der effektivsten Stimulatoren der PI3K (Whitlock et al. 2000). Distal von PI3K/Akt agiert die Serin/Threonin Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), die Mcl-1 direkt am Serin 159

phosphorylieren und inaktivieren kann (Maurer, Charvet et al. 2006). GSK-3 wird ihrerseits von den aktiven PI3K/Akt phosphoryliert und inaktiviert (Cross, Alessi et al. 1995). Außerdem können die aktiven p38 und PI3K den Enzymkomplex Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase aktivieren, was in der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und in der Aktivierung von Caspase-3 resultiert (El Benna et al. 1996; Geering, Gurzeler et al. 2011). ROS ihrerseits üben einen inhibitorischen Effekt auf die PI3K Klasse IB p110 γ aus, was eine verminderte Phosphorylierung von Akt nach sich zieht. Diese autokrine Signalkaskade trägt anscheinend zu der komplexen Regulation der spontanen PMN-Apoptose bei (Xu et al. 2010). Infolgedessen machen die zelluläre Lokalisierung, Induzierbarkeit durch Wachstumsfaktoren und die vielseitigen Effekte von PI3K/Akt und p38 diese Faktoren zu den primären Kandidaten, die die Expression, die Stabilisierung und die antiapoptotische Funktion des Mcl-1-Proteins direkt oder indirekt modulieren, und somit eine wichtige Rolle in der PMN-Apoptose spielen können.

Durch die Anwendung von spezifischen pharmakologischen Inhibitoren für PI3K und p38 konnte in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle dieser Kinasen im Serum-mediierten antiapoptotischen Signalweg in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen sowie in humanen PMN belegt werden. Das Patienten-Serum bewirkte eine Verzögerung der Apoptose, die mit einer erhöhten Mcl-1-Proteinexpression in ausdifferenzierten HL-60 Zellen sowie in humanen PMN korrelierte. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass beide Kinasen in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen antiapoptotisch wirken. Außerdem sind PI3K und p38 in die Regulation der spontanen Apoptose und der Mcl-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene in diesen Zellen involviert. Die Serum-mediierte verlängerte Lebensspanne sowie die erhöhte Mcl-1-Proteinexpression konnten durch die pharmakologische Inhibierung von PI3K und p38 signifikant aufgehoben werden. Demnach deuten diese Daten auf die Beteiligung von PI3K und p38 an der Vermittlung des Serum-mediierten antiapoptotischen Effektes sowie an der Serum-induzierten erhöhten Mcl-1-Expression in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen hin.

Der Effekt von Kinaseinhibitoren auf die Apoptose und die Mcl-1-Expression in primären humanen PMN war, im Vergleich zu HL-60 Zellen, etwas vermindert. Die Inhibitoren für PI3K und p38 bewirkten ausschließlich in Kombination eine signifikante Zunahme der Zellzahl mit niedrigem MMP sowie eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate in PMN aus gesunden Probanden. Es wurden jedoch keine signifikanten Effekte von den Inhibitoren auf die Mcl-1-Proteinexpression in Kontroll-PMN, sowie

auf die Apoptose und die Mcl-1-Proteinexpression in Kontroll-PMN, inkubiert mit dem Serum von Polytrauma-Patienten, und in PMN aus Polytrauma-Patienten beobachtet. Es lässt sich jedoch die Tendenz erkennen, dass PI3K und p38 in PMN, ebenfalls wie in ausdifferenzierten HL-60 Zellen, antiapoptotisch wirken und in die Regulation der spontanen Apoptose involviert sind. Die pharmakologische Inhibierung von PI3K und p38 konnte die Serum-medierte verlängerte Lebensspanne der PMN, sowie die erhöhte Proteinexpression von Mcl-1 lediglich zum Teil aufheben. Dessen ungeachtet lässt sich auch hier der Trend erkennen, dass PI3K und p38 in PMN, ähnlich wie in ausdifferenzierten HL-60 Zellen, an der Serum-induzierten erhöhten Mcl-1-Proteinexpression sowie am Serum-medierten antiapoptotischen Effekt beteiligt sein können.

Der Inhibitor für p38 SB203580 zeigte in humanen PMN und in HL-60 Zellen häufig, im Vergleich zu dem Inhibitor für PI3K LY294002, einen verminderten Effekt auf die Apoptose sowie auf die Expression von Mcl-1. Humane PMN exprimieren hauptsächlich die ubiquitäre Isoform p38 α , und in kleinen Mengen die zellspezifische Isoform p38 δ (Nick et al. 1999), wobei die Rolle von p38 δ für die PMN-Apoptose noch nicht erforscht ist. In HL-60 Zellen wurde die Expression von Isoformen p38 α , p38 γ und p38 δ dokumentiert (Zhang et al., 2011). Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor SB203580 hemmt die Aktivität der Isoformen p38 α und p38 β (Lee et al. 1994; Kumar et al. 1997), und hat demnach keinen inhibitorischen Effekt auf die p38 γ - und p38 δ -Isoformen. Diese, eventuell nicht ausreichende, partielle Hemmung von p38 kann zum Teil den verminderten Effekt des Inhibitors SB203580 in HL-60 Zellen sowie in PMN erklären. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass diese drei Isoformen unterschiedliche Rollen in der Regulation der Apoptose spielen, so dass z.B. p38 α antiapoptotisch, p38 γ und p38 δ proapoptotisch wirken (Ferrari et al. 2012).

Die Kombination aus beiden Inhibitoren zeigte in diesen Experimenten, im Vergleich zu den Inhibitoren einzeln, häufig einen verstärkten Effekt auf die Apoptose sowie auf die Mcl-1-Proteinexpression, jedoch nicht auf die Mcl-1 mRNA-Expression in ausdifferenzierten HL-60 Zellen. Vermutlich können beide Kinasen deren Aktivität gegenseitig modulieren (Rane et al. 2001; Derouet, Thomas et al. 2006; Geering, Gurzeler et al. 2011), wodurch eine komplexe Regulation der Apoptose geschaffen wird. Es bleibt außerdem in der Literatur umstritten, ob p38 proximal (Geering, Gurzeler et al. 2011) oder distal von Akt agiert (Derouet, Thomas et al. 2006). Von Rane *et al.* wurde in humanen PMN eine Assoziation von p38 mit Akt und der MAP Kinase-aktivierten Proteinkinase 2 (MK2) zu einem Komplex, sowie eine direkte Phosphorylierung von Akt am Serin 473 durch p38 beschrieben (Rane, Coxon et al. 2001). Ferner es ist mög-

lich, dass bei der Kombination beider Inhibitoren der Effekt des Inhibitors für p38 SB203580 in diesen Experimenten zum großen Teil auf die Wirkung des Inhibitors für PI3K LY294002 zurückzuführen ist.

Andere Arbeitsgruppen haben, bestätigend zu dieser Arbeit, ebenfalls die Involvierung von PI3K und p38 an der Vermittlung des Zytokin-medierten antiapoptotischen Effektes in humanen PMN dokumentiert. So wurde die Beteiligung von PI3K/Akt und p38 an der GM-CSF- und INF- γ -medierten Verzögerung der PMN-Apoptose (Cowburn, Cadwallader et al. 2002; Harter, Keel et al. 2002; Saffar et al. 2008) sowie die Beteiligung dieser Kinasen an der GM-CSF-induzierten erhöhten Mcl-1-Proteinexpression beschrieben (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001; Derouet, Thomas et al. 2004). Larbi *et al.* berichten dagegen über die Beteiligung von p38 an der Regulation der spontanen Apoptose, jedoch nicht an der Vermittlung des GM-CSF-medierten antiapoptotischen Effektes in humanen PMN (Larbi et al. 2005). Hirata *et al.* schildern die Involvierung von PI3K und ERK, jedoch nicht von p38, an der IL-18- und LPS-induzierten verzögerten PMN-Apoptose. Die Beteiligung dieser Kinasen an der IL-18- und LPS-induzierten erhöhten Mcl-1- und A1/Bfl1-Proteinexpression wurde dennoch nicht festgestellt (Hirata et al. 2008).

Die Daten, die in humanen PMN generiert wurden, zeigten in diesen Experimenten eine deutlich ausgeprägte Spenderabhängigkeit und somit eine sehr starke Heterogenität. Dies kann auf unterschiedlichen Aspekten beruhen. Es ist heutzutage bekannt, dass das Alter der Spender einen Aspekt darstellt, der die Funktionalität der PMN beeinflussen kann. Am häufigsten werden altersbedingt Funktionen wie Chemotaxis, oxidativer Burst sowie antibakterielle Funktionen der PMN beeinträchtigt (Ligthart et al. 1990; Fulop et al. 2004; Plackett et al. 2004). Das Probandenalter in der Kontroll- und in der Patientengruppe in dieser Arbeit war ungleich. Außerdem zeigte vor allem das Patientenkollektiv einen ziemlich großen Altersumfang. So betrug das durchschnittliche Alter der polytraumatisierten Patienten $52,4 \pm 19,2$ Jahre (Altersumfang 22 – 80 Jahre), der gesunden Probanden $34,0 \pm 9,4$ Jahre (Altersumfang 23 – 52 Jahre).

Aber nicht nur das Alter, sondern auch andere Aspekte, wie z.B. Rauchen (Guzik et al. 2011), Sport (Mooren et al. 2012; Takahashi et al. 2013) und psychologischer Stress (Khanfer et al. 2010; Ignacchiti et al. 2011; Parks et al. 2012), können die Apoptose und die Funktionalität der PMN ebenfalls deutlich beeinflussen. So können intensives körperliches Training (Mooren et al., 2012) sowie akuter psychologischer Stress (Khanfer, Phillips et al. 2010) eine Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems bewirken und eine Neutrophilie aufgrund einer verzögerten PMN-

Apoptose hervorrufen. Dagegen können Nikotin (Guzik et al., 2011), mäßige Sportübungen (Takahashi, Miyashita et al. 2013) und chronischer psychologischer Stress (Phillips et al. 2006) eine Erhöhung der PMN-Apoptose und eine Verminderung der Funktionalität der Immunzellen nach sich ziehen. Ferner können der Immunstatus und die Vorerkrankungen der Probanden ebenso die PMN-Apoptose verzögern oder erhöhen, was in einer Neutrophilie bzw. Neutropenie resultiert (Aga et al. 2002; Ramirez et al. 2004; Elbim et al. 2009; Aref et al. 2011). Somit können die heterogenen Effekte von Kinaseinhibitoren sowie von Patienten-Serum auf die Apoptose und auf die Mcl-1-Proteinexpression in PMN unterschiedlicher Probanden in diesen Experimenten, zumindest teilweise, durch die aufgeführten Aspekte erklärt werden.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass PMN durch Endotoxinspuren während und nach der Isolierung prä-aktiviert werden können. Dies kann anscheinend bestimmte apoptotische Signalkaskaden modulieren, wie z.B. die Aktivierung von MAP Kinase p38 (Nahas et al. 1996; Nick et al. 1996), so dass die spontane sowie induzierte PMN-Apoptose beeinträchtigt werden können. Dies kann genauso, zumindest teilweise, die unterschiedliche Wirkung von Kinaseinhibitoren und von Patienten-Serum auf die Apoptose und die Proteinexpression in humanen PMN, und somit die Heterogenität der Daten erklären. Infolge einer möglichen Prä-aktivierung der PMN während und nach der Isolierung ist außerdem die Extrapolation von *in vitro* Daten auf die *in vivo* Bedingungen als ziemlich kritisch und problematisch anzusehen (Aoshiba, Yasui et al. 1999).

Fernerhin ist es nicht möglich, mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll eine 100 %-ige reine PMN-Population aus dem Vollblut zu gewinnen. Trotz ziemlich hohem Anteil an PMN (> 95 %) ist eine gewisse Verunreinigung durch mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), wie Lymphozyten und Monozyten, die ca. 1 - 2 % ausmachen kann, nicht zu vermeiden. Zudem ermöglicht die Dichtegradientenzentrifugation der Blutzellen keine Auftrennung der PMN und eosinophilen Granulozyten. Die Reinheit der PMN-Population hängt daher von der Anzahl der Eosinophile im Blut des Donors ab (Edwards 1994). Die Verunreinigung der PMN-Suspension durch PBMC und eosinophile Granulozyten kann die Physiologie der PMN *in vitro* beeinträchtigen (Sabroe et al. 2002), was zu der gewissen Heterogenität der Apoptose- und Proteinexpressionsdaten beitragen könnte. Der antiapoptotische Effekt von GM-CSF auf die PMN-Apoptose (Walmsley et al. 2004) sowie auf die Mcl-1-Expression (Wardle et al. 2011) wird dennoch nicht durch die Verunreinigung der PMN durch PBMC beeinflusst.

Die PMN-Apoptose korreliert bekanntlich invers mit der Mcl-1-Expression. Ein hoher Mcl-1-Proteinlevel ist mit der Verzögerung der PMN-Apoptose, dagegen eine Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels mit der erhöhten PMN-Apoptose assoziiert (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000; Derouet, Thomas et al. 2004). Die Daten, die in diesen Experimenten in der Neutrophil-ähnlichen Zelllinie HL-60 generiert wurden, bestätigen das. Es wurde hier jedoch teilweise keine Korrelation zwischen der Apoptose und Mcl-1-Proteinexpression in humanen PMN beobachtet. In der Literatur wird spekuliert, dass die Abnahme des Mcl-1-Proteins nach der Einleitung der Apoptose durch andere Mechanismen, und nicht durch den Abbau, zustande kommen kann. So fanden Gardai *et al.*, dass das Mcl-1-Protein mit den sekretorischen Vesikeln und azurophilen Granula im Zytoplasma der humanen PMN assoziiert ist. Die aktivierten PMN können bekanntlich die Inhalte der Granula und Vesikeln freisetzen (Faurschou and Borregaard 2003), was vermutlich auch den Verlust des mit Granula assoziierten Mcl-1-Proteins bewirken kann. Somit wird von dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass eine Abnahme des zellulären Mcl-1-Proteinlevels während der Apoptose auch ohne Abbau dieses Proteins zustande kommen könnte (Gardai, Hildeman et al. 2004). Von Lee *et al.* wird berichtet, dass die Einleitung der Apoptose in der humanen myelomonozytischen Zelllinie FDC-P1 ohne proteasomale Degradierung von Mcl-1 erfolgen kann. Mcl-1 wird lediglich durch die Bindung mit proapoptotischem BH3-like Ligand Bim γ 2A in seiner antiapoptotischen Funktion gehemmt (Lee et al. 2008).

Die Balance in der Expression von pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie ist ein entscheidender Faktor in der Regulation des Überlebens und der Apoptose der PMN. Die Expression von Mcl-1, ein übergeordnetes antiapoptotisches Bcl-2 Homolog in humanen PMN, wird strikt auf verschiedenen Ebenen reguliert. Laut Ergebnissen dieser Arbeit regulieren die Kinasen PI3K und p38 die Serum-induzierte erhöhte Mcl-1-Expression auf Proteinebene. Allerdings wurde nicht genau untersucht, ob die Regulation der Mcl-1-Expression über translationsabhängige oder -unabhängige Mechanismen erfolgt.

Es ist bekannt, dass neben der Regulation der Expression auf Transkriptions- und Translationsebene, die Kinasen PI3K und p38 die antiapoptotischen zellulären Prozesse auch über translationsunabhängige Mechanismen regulieren können. Im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen können diese Kinasen über die Phosphorylierung von Apoptose-regulierenden Proteinen, u.a. von Mcl-1, die nachfolgende Stabilisierung oder Abbau, Heterodimerisierung, Inaktivierung und subzelluläre Lokalisation dieser Faktoren modulieren. So bewirken die aktiven PI3K/Akt und p38 die Phosphory-

lierung von weiteren Kinasen, wie GSK-3 (Cross, Alessi et al. 1995), von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, wie Bax oder Bad, oder von Caspasen, wie Caspase-8 oder Caspase-3 (Cowburn, Cadwallader et al. 2002; Alvarado-Kristensson, Melander et al. 2004; Gardai, Hildeman et al. 2004). Kotone-Miyahara *et al.* berichten über die GM-CSF-medierte PI3K- und MEK/ERK1/2-vermittelte posttranslationale Modifikation und Hemmung von FADD. Es verhindert folglich die Ausbildung des DISC-Komplexes, die Spaltung von Procaspase-8 und die Fas-induzierte Apoptose, was zur verzögerten PMN-Apoptose führt (Kotone-Miyahara, Yamashita et al. 2004). Es wurde die translationsunabhängige Stabilisierung von Mcl-1 und die Verzögerung der PMN-Apoptose durch den *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) beschrieben (Rossi et al. 1995; Kato et al. 2006). Der Haupteffektor von cAMP, die Proteinkinase A (PKA), kann ihrerseits GSK-3 und MAP Kinasen phosphorylieren (Sassone-Corsi 2012), die bekanntlich die Expression von Mcl-1 modulieren können.

Es ist demnach nicht auszuschließen, dass diese alternativen, antiapoptotischen, translationsunabhängigen Regulationsmechanismen von PI3K/Akt, GSK-3 und p38 zu dem Serum-medierten erhöhten Mcl-1-Proteinlevel in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen und in humanen PMN beitragen. Dadurch wird eine komplexe Regulation der Mcl-1-Expression und folglich der Apoptose in PMN unter physiologischen Bedingungen sowie nach einem schweren Trauma geschaffen.

Als Weiteres wurde hier der Abbau vom Protein Mcl-1 in PMN aus gesunden Probanden und aus Polytrauma-Patienten während der spontanen sowie induzierten Apoptose analysiert. Die Struktur und der Aufbau des Mcl-1-Proteins ermöglichen eine rapide Degradierung, was eine extrem kurze Halbwertszeit (2 – 3 h) dieses antiapoptotischen Faktors sowie eine dynamische Regulation der PMN-Apoptose gewährleisten. So besitzt Mcl-1 mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, die dessen Aktivität beeinflussen können. Die Phosphorylierung von Mcl-1 an bestimmten Aminosäure-Resten kann entweder in einer Stabilisierung oder Polyubiquitinylierung und dem nachfolgenden Abbau resultieren (Domina, Smith et al. 2000; Inoshita, Takeda et al. 2002; Maurer, Charvet et al. 2006). Die PEST-Sequenzen (Prolin, Glutamat, Serin und Threonin) am N-Terminus leiten Mcl-1 zur Polyubiquitinylierung und Degradierung in den Proteasomen (Kozopas, Yang et al. 1993). Außerdem wurden in der PEST-Region von Mcl-1 zwei konservierte Aspartatsäure-Reste 127 und 157 identifiziert, die als Spaltungsstellen für Caspasen dienen (Michels et al. 2005). Im Rahmen der extrinsischen Apoptose kann Mcl-1 durch die Caspase-8 gespalten werden (Derouet, Thomas et al. 2006; Cross,

Moots et al. 2008). Durch die Caspase-3 wird Mcl-1 zu einer kürzeren proapoptotischen Form gespalten (Clohessy, Zhuang et al. 2004).

Der PI3K/Akt-vermittelte Effekt auf Mcl-1 wird durch die konstitutiv aktive Serin/Threonin Kinase GSK-3 ausgeübt, die Mcl-1 direkt phosphorylieren kann. In der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren verbleibt GSK-3 in humanen PMN aktiv und kann Mcl-1 phosphorylieren. Dies führt zu der Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels aufgrund der Polyubiquitinylierung und Degradierung in den Proteasomen (Maurer, Charvet et al. 2006). Die Mcl-1 Ubiquitinylierungs-Ligase E3 (MULE) ist ein essentieller Faktor, der das Protein Mcl-1 polyubiquitinylieren und somit die Expression von Mcl-1 posttranslational regulieren kann (Zhong, Gao et al. 2005). Die wachstumsfaktorenabhängige Aktivierung von PI3K/Akt bewirkt die Phosphorylierung am Serin 9 und 21 und die nachfolgende Inhibierung von GSK-3 (Cross, Alessi et al. 1995), was in einer Stabilisierung von Mcl-1 und der verzögerten Apoptose resultiert (Zhao, Altman et al. 2007).

Durch die Anwendung des spezifischen Inhibitors für Proteasom MG-132 und des Breitbandinhibitors für Caspasen BocD-fmk konnte in dieser Arbeit eine wichtige Rolle für Caspasen und Proteasom in der spontanen sowie induzierten Apoptose in humanen PMN belegt werden. Außerdem konnte eine wichtige Rolle für diese Proteasen bei dem Abbau des Mcl-1-Proteins während der spontanen sowie induzierten Apoptose in Kontroll- und Patienten-PMN bestätigt werden. Unterstützend dafür wurde in der Literatur die Beteiligung von Caspasen an der Regulation der spontanen Apoptose in humanen PMN und differenzierenden myeloiden humanen HL-60 Zellen beschrieben (Santos-Beneit and Mollinedo 2000; Wardle, Burgon et al. 2011; Lucas et al. 2013).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Induktion der intrinsischen Apoptose mittels STS bzw. der extrinsischen Apoptose mittels agonistischer anti-Fas IgM Antikörper die Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels in Kontroll-PMN bewirkt, was mit der Abnahme des MMP und der Erhöhung der Apoptose korreliert. In PMN aus Polytrauma-Patienten kommt es zur Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels ausschließlich während der Fas-induzierten Apoptose. Dies geht, ebenfalls wie in Kontroll-PMN, mit der Abnahme des MMP und der Erhöhung der Apoptose einher. Nach STS-Behandlung zeigten Patienten-PMN dagegen eine deutlich ausgeprägte Resistenz. Es wurde, im Vergleich zu Kontroll-PMN, eine Stabilisierung des Mcl-1-Proteinlevels dokumentiert, die mit einer Verzögerung der Apoptose in diesen Zellen korrelierte.

Die Fas-induzierte Abnahme des MMP und des Mcl-1-Proteinlevels sowie die Erhöhung der Apoptose konnten generell durch pharmakologische Inhibierung von

Caspasen und vom Proteasom in Kontroll- und Patienten-PMN aufgehoben werden. Allerdings bewirkte diesen Effekt in Kontroll- und Patienten-PMN der Inhibitor für Caspasen BocD einzeln und in Kombination mit dem Inhibitor für Proteasom MG-132, jedoch nicht MG-132 alleine. MG-132 konnte in Kontroll-PMN die Fas-induzierte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels, jedoch nicht die Fas-induzierte Abnahme des MMP und die Erhöhung der Apoptose überwinden. In Patienten-PMN dagegen konnte die Inhibierung des Proteasoms die Fas-induzierte Abnahme des MMP, aber nicht die Fas-induzierte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels und die Erhöhung der Apoptose aufheben. Die Kombination von den beiden Inhibitoren zeigte in diesen Experimenten keinen synergistischen Effekt. Demzufolge sind vor allem die Caspasen an der Regulation der Fas-induzierten Apoptose in Kontroll- und Patienten-PMN beteiligt. Beim Fas-induzierten Mcl-1-Abbau scheint in Kontroll-PMN in erster Linie das Proteasom, in Patienten-PMN in erster Linie Caspasen involviert zu sein.

In der Literatur gibt es ebenfalls Befunde, dass während der spontanen sowie induzierten PMN-Apoptose Caspasen und Proteasom unterschiedlich beteiligt sein können. So wurde die Involvierung von Caspasen, und nicht vom Proteasom, während der Natriumsalicylat-induzierten PMN-Apoptose sowie dem Abbau von Mcl-1 während der induzierten PMN-Apoptose beobachtet (Derouet, Thomas et al. 2006). Wardle *et al.* berichten, dass die Hemmung von Caspasen mit der Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels in der frühen Phase der Apoptose (nach 8 h), dagegen mit der Erhöhung des Mcl-1-Proteinlevels in der späten Phase der Apoptose (nach 20 h) korreliert. Somit postuliert diese Arbeitsgruppe, dass der caspaseabhängige Abbau von Mcl-1 in der späten, und nicht in der frühen Phase der Apoptose erfolgt. Mcl-1 übt somit eine regulierende Funktion in der frühen Phase der Apoptose aus und kann distal die Aktivierung von Caspasen und die Einleitung der Apoptose induzieren. Der caspase- und evtl. calpainabhängige Abbau von Mcl-1 in der späten Phase der Apoptose erfolgt daher als eine Konsequenz der Apoptose und hat demnach keine regulierende Funktion mehr (Wardle, Burgon et al. 2011). Es wird außerdem die Phosphorylierung und der proteasomabhängige Abbau von Mcl-1 während der spontanen (Derouet, Thomas et al. 2004; Derouet, Thomas et al. 2006) sowie GM-CSF- und Flavonoid-induzierten Apoptose in humanen PMN dokumentiert (Derouet, Thomas et al. 2006; Lucas et al. 2012). Die Involvierung von Caspasen und Calpainen in die Regulation des Mcl-1-Abbaus während der spontanen Apoptose in humanen PMN wurde dagegen nicht beobachtet (Derouet, Thomas et al. 2004).

Die pharmakologische Inhibierung von Caspasen und vom Proteasom konnte in Kontroll-PMN generell die STS-induzierte Abnahme des MMP und die Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels sowie die Erhöhung der Apoptose verhindern. Der Inhibitor für Proteasom MG-132 alleine konnte allerdings die STS-induzierte Zunahme der Apoptose nicht überwinden. Anscheinend sind in erster Linie Caspasen an der Regulation der STS-induzierten Apoptose in Kontroll-PMN beteiligt. Die STS-mediierte Abnahme des Mcl-1-Proteinlevels konnte in Kontroll-PMN nur durch die Kombination beider Inhibitoren, und nicht durch die Inhibitoren einzeln, aufgehoben werden. Die Kombination aus beiden Inhibitoren zeigte in diesen Experimenten einen verstärkten Effekt auf die Mcl-1-Proteinexpression. Daraus lässt sich schließen, dass in den STS-induzierten Abbau von Mcl-1 offensichtlich sowohl das Proteasom als auch Caspasen in gleichem Maße involviert sind. Die Beteiligung von Caspasen wurde während der STS-induzierten Apoptose in humanen Melanom-Zelllinien dokumentiert, obgleich in humanen Brustkrebszellen MCF-7 und in murinen Leukämie-Zelllinien L1210 sowohl caspaseabhängige als auch -unabhängige STS-induzierte Apoptose beschrieben wurde (Belmokhtar et al. 2001; Xue et al. 2003). Ein STS-induzierter, GSK-3 β -abhängiger Abbau von Mcl-1 wurde in HeLa Zellen beobachtet (Ding, He et al. 2007).

Nach Hemmung von Caspasen und/oder vom Proteasom blieben Patienten-PMN weiterhin gegen STS resistent. Vermutlich ist die Aktivität von Caspasen in Patienten-PMN bereits (evtl. Zytokin-mediiert) gehemmt, so dass eine zusätzliche Inhibierung keinen Effekt auf die Apoptose sowie auf die Mcl-1-Proteinexpression nach STS-Behandlung in diesen Zellen bewirkt. Außerdem kann Mcl-1, vermutlich aufgrund der Serum-mediierten Aktivierung von Akt und Hemmung von GSK-3, nicht phosphoryliert und dadurch nicht für die Polyubiquitinylierung und den nachfolgenden Abbau in den Proteasomen markiert werden. Somit hat anscheinend die Inhibierung des Proteasoms während der intrinsischen Apoptose in Patienten-PMN ebenso keinen Effekt auf die Apoptose und auf die Mcl-1-Proteinexpression.

Von Derouet *et al.* wird postuliert, dass die GM-CSF-induzierte erhöhte Mcl-1-Expression durch transkriptionsunabhängige Mechanismen reguliert wird, und in erster Linie die Mcl-1-Expressionsänderungen auf Proteinebene bewirkt. Somit entfalten Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF, ihre antiapoptotische Wirkung indem sie in erster Linie die proteasomale Degradierung des Mcl-1-Proteins hemmen und dadurch die Stabilisierung dieses Faktors nach sich ziehen (Derouet, Thomas et al. 2004). Außerdem ist die Polyubiquitinylierung von Mcl-1 ein reversibler Prozess und kann durch

die Deubiquitinase USP9X aufgehoben werden (Schwickart et al. 2010), was ebenfalls in der Stabilisierung von Mcl-1 resultiert.

Die Erhöhung des Mcl-1-Proteinlevels nach GM-CSF-Behandlung ist demnach auf die Verzögerung des Mcl-1-Abbaus (durch Hemmung von Proteasomen) und auf die daraus resultierende Stabilisierung dieses Proteins zurückzuführen, was seinerseits durch PI3K/Akt- und ERK/MEK-Signalwege vermittelt wird. Posttranslationale Modifikationen von Mcl-1, wie Hyperphosphorylierung, können den GM-CSF-medierten Effekt auf die Stabilisierung dieses Faktors und auf die Verzögerung der Apoptose in humanen PMN aufheben (Derouet, Thomas et al. 2004). Die Phosphorylierung durch die Kinase GSK-3, die nachfolgende Polyubiquitylierung durch die E3 Ligase MULE und die proteasomale Degradierung des Mcl-1-Proteins wurden vor kurzem als essentielle proapoptotische Mechanismen in HeLa und in Jurkat Zellen sowie in murinen pro-B-Zellen der lymphoiden Zelllinie FL5.12 beim Zytokinentzug beschrieben (Zhong, Gao et al. 2005; Maurer, Charvet et al. 2006). Unterstützend dafür wurde über den glykoseabhängigen antiapoptotischen Signalweg in murinen myeloiden Zelllinien berichtet, bei dem die erhöhte Glykolyserate mit der Phosphorylierung und Inhibierung von GSK-3 α/β am Serin 21 und 9 und der Stabilisierung von Mcl-1 korreliert (Zhao, Altman et al. 2007).

Dies bestätigt unsere Beobachtungen, dass der erniedrigte Mcl-1-Proteinlevel während der spontanen sowie induzierten PMN-Apoptose in erster Linie auf die Veränderungen der Mcl-1-Expression auf Proteinebene, aufgrund des Abbaus dieses Proteins in den Proteasomen und/oder durch Caspasen, zurückzuführen ist. Dagegen kann die in dieser Arbeit gezeigte Stabilisierung des Mcl-1-Proteins in PMN aus Polytrauma-Patienten nach der Einleitung des intrinsischen Apoptosesignalweges mittels STS vermutlich ebenfalls auf die Veränderungen der Mcl-1-Expression auf Proteinebene zurückgeführt werden, und zwar auf die Hemmung des Abbaus dieses Proteins in den Proteasomen und/oder durch Caspasen.

Um die molekularen Mechanismen der Serum-induzierten Mcl-1-Stabilisierung näher zu untersuchen, wurde hier zusätzlich die Proteinexpression der Kinase Akt sowie der von Akt distal agierenden GSK-3 analysiert, die, wie bereits oben erwähnt, die Mcl-1-Proteinexpression direkt modulieren können. Die Daten dieses Experimentes charakterisieren sich, ähnlich wie im früher beschriebenen Experiment mit Kinaseinhibitoren für PI3K und p38, LY294002 und SB203580, ebenfalls durch eine deutlich ausgeprägte Spenderabhängigkeit und somit durch eine sehr starke Heterogenität. Es lässt sich dennoch sagen, dass das Serum von Polytrauma-Patienten in PMN aus gesunden Probanden

eine verstärkte Phosphorylierung von Akt, die für die aktive Akt-Form charakteristisch ist, bewirkte. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Phosphorylierung (am Serin 21 und 9) von Isoformen GSK-3 α und GSK-3 β dokumentiert, die jedoch den inaktiven Formen dieser Kinase entsprechen. Außerdem führte STS zu einzelnen untersuchten Zeitpunkten zu einer leichten Abnahme der aktiven Akt-Form sowie von inaktiven GSK-3-Isoformen, die durch das Patienten-Serum aufgehoben werden konnte. Hiermit lässt sich schließen, dass das Patienten-Serum und der intrinsische Apoptoseinduktor STS den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivität beider Kinasen modulieren können.

Somit verbleibt Akt in Anwesenheit des Patienten-Serums nach der Einleitung der intrinsischen Apoptose mittels STS phosphoryliert und aktiv, was mit der Phosphorylierung und der Inaktivierung von GSK-3 korreliert. Die Phosphorylierung durch GSK-3 und der nachfolgende Abbau von Mcl-1 werden somit gehemmt. Durch diese Mechanismen könnte das Patienten-Serum den stabilisierenden Effekt auf das Mcl-1-Protein sowie auf die Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln. Die inhibitorischen Effekte von STS auf Kinasen PI3K/Akt und ERK1/2 (Zha et al. 1996; Yamaki et al. 2002), obgleich ein aktivierender Effekt auf GSK-3 β und der STS-induzierte GSK-3 β -vermittelte Abbau von Mcl-1 (Ding, He et al. 2007) wurden, bestätigend zu diesen Daten, auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben.

Wie die Ergebnisse in dieser und in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, kann die intrinsische Apoptoseresistenz in Patienten-PMN mittels agonistischer anti-Fas IgM Antikörper überwunden werden. Wie bereits oben beschrieben, wird die Fas-induzierte Apoptose sowie der Fas-induzierte Mcl-1-Abbau in Patienten-PMN vor allem durch Caspasen, und nicht durch das Proteasom, reguliert. Dagegen sind in Kontroll-PMN vermutlich in den Fas-induzierten Abbau von Mcl-1 in erster Linie das Proteasom, in den STS-induzierten Abbau von Mcl-1 Caspasen und Proteasom in gleichem Maße einbezogen. Anscheinend beeinflussen die verschiedenen extra- und intrazellulären Signale die Aktivität beider Proteasen. Es ist auch anzunehmen, dass die posttranslationalen Modifikationen von Mcl-1, wie Phosphorylierung an bestimmten Aminosäure-Resten, die Präferenz für eine bestimmte Abbauf orm modulieren können. Eine erhöhte Phosphorylierung durch GSK-3 und nachfolgende Polyubiquitinylierung von Mcl-1 in Kontroll-PMN kann die Involvierung vor allem von den Proteasomen in den Mcl-1-Abbau während der spontanen sowie Fas-induzierten Apoptose in diesen Zellen erklären.

In PMN aus Polytrauma-Patienten verbleibt die Kinase Akt offenbar phosphoryliert und aktiv und kann die distal agierende Kinase GSK-3 phosphorylieren und inhibieren. Die daraus resultierende Hemmung der Mcl-1-Phosphorylierung könnte die nachfolgende proteasomale Degradierung von Mcl-1 während der extrinsischen Apoptose in Patienten-PMN hindern, jedoch angeblich nicht die Spaltung durch Caspasen. Außerdem ist bekannt, dass Mcl-1 mit den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie heterodimerisieren kann. Dadurch wird vermutlich nicht nur die Hemmung von proapoptotischen Faktoren erreicht, sondern die Aktivität von Mcl-1 moduliert. So wurde in der humanen Myeloma-Zelllinie RPMI-8226 und in der humanen embryonalen Nieren-Zelllinie Hek-293 ein reziproker Schutz von Mcl-1 und Bim gegen den Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Abbau dokumentiert (Wuilleme-Toumi, Trichet et al. 2007). Eine mögliche Assoziierung von Mcl-1 mit den proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie in PMN nach einem schweren Trauma könnte die Hemmung vor allem der proteasomalen Degradierung von Mcl-1 während der Fas-induzierten Apoptose erklären.

Während der spontanen sowie Fas-induzierten PMN-Apoptose kommt es zur Erhöhung der Aktivität von Caspasen, wie Caspase-8 und Caspase-3 (Alvarado-Kristensson, Porn-Ares et al. 2002). Die Wachstumsfaktoren üben eine inhibitorische Wirkung auf Caspasen aus. So bewirken die GM-CSF-aktivierten PI3K/Akt und p38 u.a. die Phosphorylierung und Inaktivierung der Caspase-8 und Caspase-3 (Cowburn, Cadwallader et al. 2002; Alvarado-Kristensson, Melander et al. 2004; Gardai, Hildeman et al. 2004), die bekanntlich Mcl-1 spalten und inaktivieren können (Clohessy, Zhuang et al. 2004; Derouet, Thomas et al. 2006; Cross, Moots et al. 2008). Bestätigend dafür wurde in einem Apoptose-Array eine deutlich verminderte Expression von Procaspase-3 in PMN aus polytraumatisierten Patienten, im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden, dokumentiert (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Kotone-Miyahara *et al.* beschreiben eine GM-CSF-abhängige Hemmung der Spaltung der Procaspase-8 (Kotone-Miyahara, Yamashita et al. 2004). Eine wachstumsfaktorenabhängige Inhibition von GSK-3 (Cross, Alessi et al. 1995) trägt anscheinend ebenfalls zum Schutz von Mcl-1 gegen den Abbau und somit zu der Stabilisierung dieses Proteins bei. Infolgedessen wird in Patienten-PMN durch komplexe Mechanismen, wie Hemmung der Expression und Aktivität von Caspasen und Modulation der Aktivität von Kinasen, die Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 und eine Verzögerung der Apoptose erreicht.

Als Weiteres konnte hier gezeigt werden, dass die Herunterregulation der Mcl-1-Proteinexpression mittels siRNA mit einer signifikanten Erhöhung der Apoptose nach Behandlung mit STS, und somit mit einer Erhöhung der Sensitivität dieser Zellen für intrinsische Apoptose korrelierte. Infolgedessen konnte die Serum-vermittelte intrinsische Apoptoseresistenz in Patienten-PMN, zumindest partiell, aufgehoben werden. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Mcl-1 an der Ausbildung der Serum-vermittelten verzögerten Apoptose sowie intrinsischen Apoptoseresistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma beteiligt ist. Die Ausschaltung der Mcl-1-Expression in differenzierenden Zellen der humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie U-937 (Bazzoni et al. 1999; Moulding et al. 2000) sowie in humanen und in murinen PMN (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000; Dzhagalov et al. 2007) war ausreichend, um Apoptose in diesen Zellen zu erhöhen. Die Virus-induzierte verzögerte Apoptose in humanen Monozyten (Chan et al. 2010), die Glykolyse-medierte verzögerte Apoptose in der murinen pro-B-Zellen lymphoiden Zelllinie FL5.12 (Zhao, Altman et al. 2007) sowie die GM-CSF-vermittelte verzögerte Apoptose in humanen PMN (Edwards et al. 2003) konnte nach der spezifischen Ausschaltung des Mcl-1-Proteins aufgehoben werden. Die Herabregulation des Mcl-1-Proteinlevels in humanen Myeloma-Zellen erhöhte die Sensitivität dieser Zellen gegen den Proteasominhibitor Bortezomib (Gomez-Bougie et al. 2007).

Es ist jedoch anzunehmen, dass Mcl-1 nicht der einzige Faktor ist, der die Verzögerung der Apoptose sowie die Ausbildung der Apoptoseresistenz in PMN nach einem schweren Trauma reguliert. Es ist höchstwahrscheinlich ein komplexer Regulationsmechanismus, an dem weitere Faktoren der Bcl-2 Familie einbezogen sein können. So wurde von Hamasaki *et al.* die Relevanz von *Al-a*, einem Subtyp des *Al*-Gens für die Apoptose in Maus dokumentiert (Hamasaki et al. 1998). Die Ausschaltung des proapoptotischen Mitgliedes der Bcl-2 Familie Puma in humanen PMN resultierte in der verzögerten Apoptose in diesen Zellen, einer anhaltenden Entzündung sowie einer unkontrollierten bakteriellen Infektion (Garrison et al. 2010). Außer Faktoren der Bcl-2 Familie können in diesen Prozess auch andere Mechanismen bzw. Signalwege involviert sein, die proximal (wie z.B. PI3K/Akt, p38, Initiatorcaspasen) und distal (Effektorcaspasen) von den Mitochondrien sowie direkt an den Mitochondrien (z.B. GSK-3) agieren.

Die Serum-induzierten Kinase-vermittelten posttranslationalen Modifikationen der Proteine der Bcl-2 Familie, wie z.B. Phosphorylierung, modulieren die Aktivität dieser Faktoren nicht nur durch die Stabilisierung bzw. Abbau, sondern auch durch die Heterodimerisierung und die subzelluläre Lokalisation. Mcl-1 wird als Faktor angese-

hen, der kein direktes intrinsisches oder selbständiges antiapoptotisches Potential aufweist. Das Protein Mcl-1 besitzt Domänen BH1-3 und charakterisiert sich durch die Abwesenheit der BH4-Domäne. Dieses Merkmal ermöglicht dem Mcl-1-Protein die Interaktionen mit Proteinen, die dieses Motiv enthalten (Derouet, Thomas et al. 2004). Es wird demnach postuliert, dass Mcl-1 seine antiapoptotische Wirkung entfaltet, indem es mit proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie interagiert und diese in ihrer Funktion hemmt. Folglich wird dadurch die Translokation dieser proapoptotischen Proteine zu den Mitochondrien verhindert, was die Integrität der Mitochondrien aufrechterhält und die Apoptose inhibiert (Dorward et al. 2012). Die Überexpression von Mcl-1 kann die Apoptose verzögern (Reynolds et al. 1994). Dagegen ist das proapoptotische Protein Bax für die Einleitung der PMN-Apoptose essentiell, und kann durch antiapoptotische Stimuli in seiner Funktion unterdrückt werden (Pryde et al. 2000). Generell wird Bax in der Literatur, neben Mcl-1, als Schlüsselfaktor der Apoptose in humanen PMN und in hematopoetischen Zellen beschrieben (Zhou et al. 1998; Weinmann, Gaetgens et al. 1999).

Daher wurde hier als Nächstes untersucht, ob und mit welchen proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie Mcl-1 interagieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass Mcl-1 mit proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie Bax, Bid, Bik, Bad, Bim und Puma, interagiert. Außerdem wurde eine erhöhte Co-Immunpräzipitation von Mcl-1 mit Bax, Bad, Bik und Bid in PMN aus Polytrauma-Patienten, im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden, dokumentiert.

In der Literatur gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass Mcl-1 mit proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. mit Bax, interagieren kann, und diese Interaktionen durch Zytokine moduliert werden können. Somit bewirken Zytokine, u.a. GM-CSF, eine Umstellung des PMN-Phänotyps vom pro- zum antiapoptotischen (Larbi, Douziech et al. 2005). So wird über eine erhöhte Heterodimerisierung von Mcl-1 mit Bax nach der Behandlung der PMN mit GM-CSF berichtet (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001; Gardai, Hildeman et al. 2004). Außerdem ist die Interaktion von Bax mit einem weiteren antiapoptotischen Protein in humanen PMN, dem Bcl-x_L, beschrieben (Altnauer, Conus et al. 2004; Gardai, Hildeman et al. 2004). Es wird postuliert, dass Bcl-x_L mit der vollen, und nicht mit der gespaltenen aktiven Form von Bax, direkt interagieren und dadurch seine mitochondriale Lokalisation verhindern kann (Altnauer, Conus et al. 2004). In humanen B-Zellen (Gomez-Bougie, Bataille et al. 2005) sowie in murinen T-Zellen (Zhu et al. 2004) wurde die Interaktion von Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-x_L mit dem proapoptotischen Protein Bim an den Mitochondrien beschrieben. Dadurch

wird Bim in seiner proapoptotischen Funktion gehemmt, und folglich die zytosolische Translokation von Bim sowie die Bim-vermittelte Aktivierung von Bax inhibiert.

Es wird außerdem postuliert, dass die Zytokin-medierte PI3K/Akt-vermittelte Phosphorylierung von proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. von Bax oder Bad, die Heterodimerisierung von Mcl-1 mit Bax in humanen PMN begünstigen kann. So bewirkt die GM-CSF-vermittelte PI3K/Akt-abhängige Phosphorylierung von Bax am Serin 184 seine zytosolische Lokalisation und Heterodimerisierung mit den antiapoptotischen Proteinen Mcl-1 und Bcl-x_L (Gardai, Hildeman et al. 2004). Cowburn *et al.* beschreiben eine GM-CSF-medierte, PI3K-abhängige Phosphorylierung von Bad, die vermutlich die nachfolgende Heterodimerisierung von Mcl-1 mit weiteren proapoptotischen Faktoren, wie z.B. Bax, stimulieren kann (Cowburn, Cadwallader et al. 2002). Die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Bad am Serin 112 und 136 verändert die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins und hemmt es in seiner proapoptotischen Funktion. Die Phosphorylierung verhindert vermutlich die Heterodimerisierung von Bad mit den antiapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. mit Bcl-x_L oder Mcl-1, an den Mitochondrien. Dies bewirkt die Translokation von Bad von der mitochondrialen Außenmembran ins Zytosol, wo es vermutlich mit dem regulatorischen Protein 14-3-3 interagiert (Yang et al. 1995; Zha et al. 1996; Cowburn, Cadwallader et al. 2002). Die befreiten antiapoptotischen Faktoren, wie Mcl-1, können nun mit weiteren proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, wie z.B. mit Bax, interagieren. Diese werden folglich in ihrer proapoptotischen Funktion gehemmt.

Außerdem moduliert die GM-CSF-vermittelte Heterodimerisierung nicht nur die Aktivität der proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie, sondern auch die Aktivität, Stabilisierung und Abbau von Mcl-1 (Derouet, Thomas et al. 2004; Wullemme-Toumi, Trichet et al. 2007). Die verstärkte Heterodimerisierung könnte das Mcl-1-Protein auch vor dem Abbau schützen (z.B. in den Proteasomen), was zu der Stabilisierung von Mcl-1 und somit zu der verzögerten Apoptose in PMN nach einem schweren Trauma beitragen könnte.

In einem weiteren Schritt sollten in dieser Arbeit die Folgen des Mcl-1-Abbaus nach Apoptoseeinleitung in Kontroll-PMN sowie die Folgen der Mcl-1-Stabilisierung nach STS-Behandlung in Polytrauma-PMN näher untersucht werden. Die Degradierung von Mcl-1 korreliert häufig mit der Erhöhung der Apoptose (Maurer, Charvet et al. 2006) und stellt somit eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung und mitochondriale Translokation von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie Bax und Bak dar (Nijhawan et al. 2003). Diese Faktoren können die Freisetzung proapoptotischer Protei-

ne aus den Mitochondrien ins Zytosol und die Abnahme des MMP bewirken, wodurch der *point of no return* der apoptotischen Kaskade erreicht wird (Eskes et al. 1998; Jurgensmeier et al. 1998). Die Stabilisierung von Mcl-1 aufgrund der Hemmung der Phosphorylierung durch die GSK-3 kann diesen Prozess aufheben (Maurer, Charvet et al. 2006). In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, ob die Stabilisierung des Mcl-1-Proteins in PMN nach einem schweren Trauma die Aktivierung und die subzelluläre Lokalisation der proapoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie beeinflussen, und vielleicht auf diese Weise die Aufrechterhaltung des MMP und eine Verzögerung der Apoptose bewirken kann.

Es konnte gezeigt werden, dass in PMN gesunder Probanden während der spontanen sowie induzierten Apoptose die Translokation proapoptotischer Proteine Bax und Bid zu den Mitochondrien stattfand. Neben den vollen Proteinen wurden außerdem die gespaltenen, aktiven Formen von Bax und Bid, tBax und tBid, in den zytosolischen und in den mitochondrialen Fraktionen dokumentiert. An dieser Stelle muss jedoch vermerkt werden, dass anders wie für Bax, die Spaltung von Bid zu tBid nur bei einzelnen PMN-Spendern detektiert wurde. Während der induzierten Apoptose wurde die mitochondriale Translokation von Bax überwiegend in der gespaltenen Form als tBax beobachtet, wobei Bid annähernd in gleichem Maße in der vollen sowie in der kürzeren Form zu den Mitochondrien transloziert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in PMN aus Polytrauma-Patienten nach der Einleitung der extrinsischen Apoptose erzielt.

Die Translokation von Bax zu den Mitochondrien in Kontroll-PMN nach der Einleitung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose, sowie in Patienten-PMN ausschließlich nach der Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges wurde außerdem mittels Immunfluoreszenz bestätigt.

Ferner korrelierte die Aktivierung und die mitochondriale Translokation von Bax und Bid in Kontroll-PMN während der intrinsischen und extrinsischen Apoptose, sowie in Patienten-PMN während der extrinsischen Apoptose mit dem Austritt von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol.

Maiani *et al.* beschreiben ebenfalls die mitochondriale Translokation von Bax, die Spaltung und die mitochondriale Translokation von Bid/tBid, sowie die nachfolgende Freisetzung mitochondrialer proapoptotischer Faktoren, wie Smac/DIABLO und HtrA2/Omi, ins Zytosol während der spontanen PMN-Apoptose. Das Signal für tBid wurde hauptsächlich in der zytosolischen Fraktion detektiert. Die Translokation von Bid zu den Mitochondrien wurde überwiegend in der vollen Form, von Bax ausschließlich in der vollen Form beobachtet, wobei das Signal für tBax nicht detektiert wurde

(Maianski, Roos et al. 2004). Von Altnauer *et al.* wurde dagegen die Spaltung von Bax zu tBax während der spontanen sowie Fas-induzierten PMN-Apoptose dokumentiert (Altnauer, Conus et al. 2004). Van Raam *et al.* beschreiben die Spaltung sowie die mitochondriale Translokation beider proapoptotischer Faktoren, Bax und Bid, was mit dem Austritt von Smac aus den Mitochondrien während der spontanen Apoptose in humanen PMN korrelierte. In humanen Melanom-Zelllinien wurde die STS-induzierte Aktivierung sowie die mitochondriale Translokation von Bax beschrieben, die mit dem Austritt von Cytochrom *c*, AIF und Smac/DIABLO aus den Mitochondrien, der Abnahme des MMP und der Aktivierung von Caspase-3 korrelierte (Zhang et al. 2004).

Das aktive Protein Bax oligomerisiert an den Mitochondrien (Yethon et al. 2003) und kann direkt Poren in der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden (Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Eskes, Desagher et al. 2000). Die genaue Rolle von Bid/tBid bleibt dagegen bis heute unklar. Laut Daten dieser Arbeit wird Bid in der vollen als auch in der gespaltenen Form zu den Mitochondrien transloziert und spielt vermutlich in gleichem Maße, direkt oder indirekt, eine Rolle in der MOMP. In der Literatur wird einerseits beschrieben, dass Bid seine proapoptotische Wirkung entfaltet, indem es die Konformationsänderungen und Oligomerisierung sowie die mitochondriale Lokalisation von Bax induziert (Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Eskes, Desagher et al. 2000). So stellen die Arbeitsgruppe Maianski die Hypothese auf, dass nicht die Spaltung von Bid, sondern vielmehr die Interaktionen zwischen tBid und Bax, sowie die nachfolgende Aktivierung von Bax durch tBid, für die PMN-Apoptose essentiell sind (Maianski, Roos et al. 2004). Von anderen Autoren wird dagegen postuliert, dass Bid in der vollen und/oder gespaltenen Form zu den Mitochondrien transloziert wird, und ebenfalls wie Bax, selbst Poren in der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden kann (Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Eskes, Desagher et al. 2000; Grinberg, Sarig et al. 2002). So beschreiben Kuwana *et al.* die Assoziation von Bax mit Bid und mitochondrialen Lipiden zu einem Komplex, der anschließend Poren in der äußeren mitochondrialen Membran ausbilden kann (Kuwana, Mackey et al. 2002).

Nach der Behandlung von PMN aus Polytrauma-Patienten mit STS wurde eine deutliche Verminderung der Spaltung sowie der mitochondrialen Translokation von Bax und Bid dokumentiert. Die Signale für die vollen, nicht gespaltenen Formen von Bax und Bid wurden überwiegend in den zytosolischen Fraktionen detektiert. Die verminderten Spaltung und mitochondriale Translokation von Bax und Bid in Patienten-PMN gingen nach der Einleitung des intrinsischen Apoptosesignalweges mittels STS, wie erwartet, mit der Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom *c* einher. Mehrere Ar-

beitsgruppen haben ebenfalls die Zytokin-medierte Hemmung der mitochondrialen Translokation von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie beschrieben. So korrelierte die GM-CSF- und G-CSF-medierte Verzögerung der PMN-Apoptose mit der Hemmung der mitochondrialen Translokation von Bax und Bid/tBid, sowie mit der Hemmung der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren ins Zytosol (Maianski, Roos et al. 2004; Dragon, Saffar et al. 2008). Van Raam *et al.* haben dagegen keinen G-CSF-vermittelten Effekt auf die mitochondriale Translokation von Bax/tBax, Bid/tBid, Freisetzung von proapoptotischen Proteinen und das MMP, obgleich eine Verzögerung der PMN-Apoptose dokumentiert (van Raam, Sluiter et al. 2008).

Die Interaktionen von Mcl-1 mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie sowie die subzelluläre Lokalisation dieser Faktoren können, wie bereits oben erwähnt, in gleichem Maße durch die posttranslationalen Modifikationen von Mcl-1 sowie durch die posttranslationalen Modifikationen seiner Interaktionspartner moduliert werden. Dieser Mechanismus kann somit gleicherweise zu der Hemmung der mitochondrialen Translokation der proapoptotischen Faktoren, und folglich zu der verzögerten Apoptose und der Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach einem schweren Trauma beitragen. So beschreiben Gardai *et al.* die GM-CSF-medierte PI3K/Akt-abhängige Phosphorylierung von Bax am Serin 184, die die Heterodimerisierung dieses Faktors mit antiapoptotischen Mcl-1, Bcl-x_L und A1/Bfl1 im Zytosol fördert und somit die mitochondriale Translokation verhindert. Apoptotische Zellen zeigen entsprechend einen verminderten Level des phosphorylierten Bax im Zytosol, was mit der erhöhten Spaltung und Aktivierung von Bax, sowie mit der erhöhten Translokation von Bax zu den Mitochondrien korreliert (Gardai, Hildeman et al. 2004).

Der Zytokin-medierte antiapoptotische Effekt wird demnach auch über die proapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie, wie Bax und Bid, vermittelt. Es wurde in dieser Arbeit und von anderen dokumentiert, dass Zytokine oder Serum der Polytraumapatienten, die Hemmung der Bax- und Bid-Translokation zu den Mitochondrien bewirkten (Gardai, Hildeman et al. 2004; Maianski, Roos et al. 2004; Dragon, Saffar et al. 2008), obgleich die Faktoren, die dies direkt modulieren können, unklar sind. Als geeignete Kandidaten dafür werden in der Literatur die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie angesehen. Es wurde bereits in dieser Arbeit, sowie von anderen gezeigt, dass Mcl-1 mit Bax und Bid in humanen PMN interagieren kann (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001; Gardai, Hildeman et al. 2004), und demzufolge die Zytokin-medierte Hemmung der mitochondrialen Translokation dieser Faktoren vermitteln könnte. Ein weiterer Kandidat ist Bcl-x_L, für den ebenfalls die Interaktion mit Bax in

humanen PMN beschrieben wurde (Gardai, Hildeman et al. 2004). Außerdem konnte für ein weiteres antiapoptotisches Protein in humanen PMN, A1/Bfl1, die Interaktion mit proapoptotischen Bax, Bid, Bad und Bik gezeigt werden (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe), die ebenfalls zu der Hemmung der mitochondrialen Translokation dieser Faktoren und somit zur Aufrechterhaltung des MMP beitragen könnte. Die Interaktion von A1/Bfl1 mit Bak und tBid und die daraus resultierende Hemmung von Bax und Bak wurde in HeLa Zellen beschrieben (Simmons et al. 2008).

Basierend auf Daten dieser Arbeit und aktueller Literatur wird hier ein vermeintlicher Serum-vermittelter Signalweg postuliert, der in humanen PMN nach einem schweren Trauma aktiviert wird und eine Verzögerung der konstitutiven Apoptose bewirken sowie die intrinsische Apoptoseresistenz gegen STS vermitteln kann (Abb. 5.1). Die essentiellen Elemente dieser Signalkaskade sind die Kinasen PI3K/Akt, p38 und GSK-3, sowie die Faktoren der Bcl-2 Familie, wie Mcl-1, Bax und Bid.

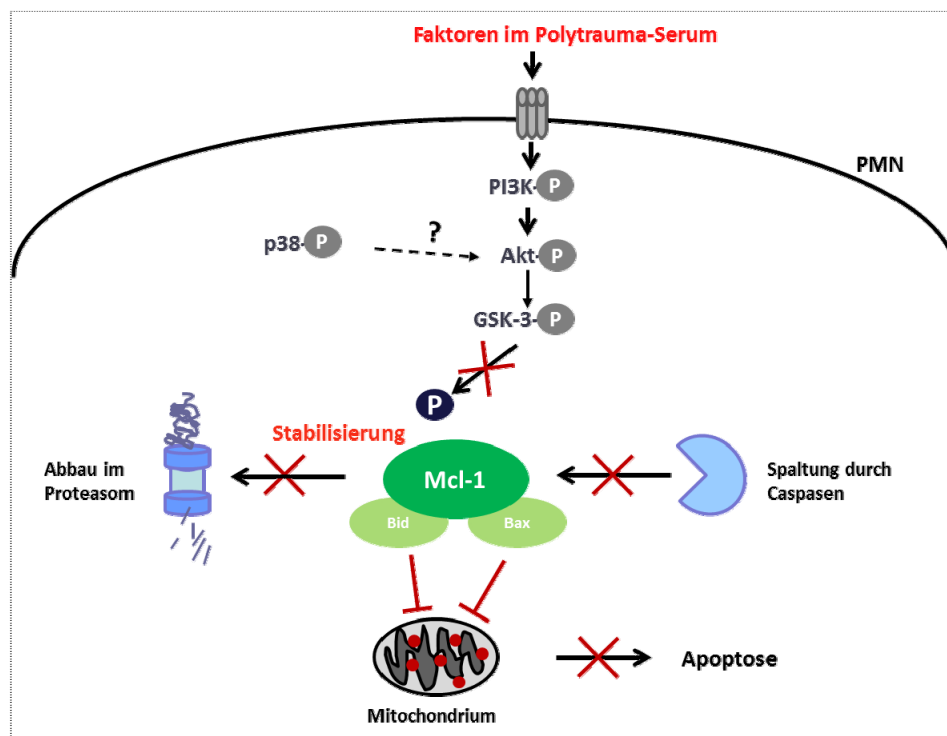


Abbildung 5.1. Die *bis dato* unbekannte Faktoren im Serum von Polytrauma-Patienten induzieren den antiapoptotischen Signalweg in humanen PMN und bewirken eine Verzögerung der Apoptose (schematische Darstellung).

Die Faktoren im Patienten-Serum bewirken, anscheinend durch die Phosphorylierung und Aktivierung vom PI3K/Akt-Signalweg (und evtl. von p38), die Phosphorylierung und Hemmung von GSK-3. Somit wird die Phosphorylierung durch GSK-3 und nachfolgender proteasomaler Abbau von Mcl-1 gehemmt, was in der Stabilisierung von Mcl-1 resultiert. An der Stabilisierung von Mcl-1 sind anscheinend auch die Caspasen beteiligt. Die Folgen der Mcl-1-Stabilisierung sind erhöhte Heterodimerisierung von Mcl-1 mit proapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, wie Bax und Bid, wodurch ihre mitochondriale Translokation jedoch blockiert wird. Dies resultiert in der Hemmung der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien ins Zytosol, der Aufrechterhaltung des MMP und folglich in der Verzögerung der konstitutiven PMN-Apoptose. Die Stabilisierung von Mcl-1, vermittelt durch PI3K/Akt/GSK-3-Signalweg, ist vermutlich für die Ausbildung der Resistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma essentiell.

Die *bis dato* unbekannte Faktoren im Patienten-Serum bewirken, vermutlich durch die Phosphorylierung und Aktivierung von PI3K/Akt (und evtl. von p38) und die nachfolgende Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3, die Hemmung des Abbaus durch Caspasen und/oder in den Proteasomen und die daraus resultierende Stabilisierung von Mcl-1. Dadurch wird vermutlich die Heterodimerisierung von Mcl-1 mit proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wie Bax und Bid, begünstigt, ihre mitochondriale Translokation jedoch gehemmt. Dies resultiert in der Hemmung der Freisetzung von mitochondrialen proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom *c*, ins Zytosol, der Aufrechterhaltung des MMP und der Verzögerung der spontanen PMN-Apoptose. Der PI3K/GSK-3/Mcl-1-Signalweg wurde als ein wichtiger antiapoptotischer Signalweg auch für neuronale (Mori et al. 2004) und hematopoetische Zellen postuliert (Maurer, Charvet et al. 2006).

Die Daten dieser Arbeit bekräftigen die Hypothese, dass die Regulation der Apoptose in humanen PMN eng mit der Expression des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 verbunden ist. Des Weiteren sind die Hemmung des Abbaus von Mcl-1 sowie die daraus resultierende Stabilisierung dieses nicht redundanten antiapoptotischen Proteins essentiell für die verzögerte spontane Apoptose sowie für die Ausbildung der intrinsischen Apoptoseresistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma. An dieser Stelle muss auch erwähnt werden, dass die genauen proapoptotischen Wirkmechanismen von STS bis heute umstritten und unzureichend untersucht bleiben, was die vollständige Aufklärung von molekularen Mechanismen der intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten erschwert.

Mcl-1 bleibt bis heute der einzige am besten erforschte antiapoptotische Faktor der Bcl-2 Familie in humanen PMN, obgleich die Expression weiterer antiapoptotischer Faktoren in PMN, wie Bcl-x_L und A1/Bfl1, belegt wurde (Chuang, Yee et al. 1998; Cowburn, Cadwallader et al. 2002). Von unserer Arbeitsgruppe und von anderen wird für Mcl-1 eine bedeutende Rolle in der Regulation der PMN-Apoptose bzw. des PMN-Überlebens postuliert. Es wurde jedoch beschrieben, dass GM-CSF die Apoptose in Maus mit dem myeloiden spezifischen Mcl-1-Defekt verzögern (Dzhagalov, St John et al. 2007) und die Apoptose in humanen PMN auch durch Mcl-1-unabhängige Mechanismen regulieren kann (Wardle, Burgon et al. 2011). Die murinen A1/Bfl1-defizienten PMN zeigen dagegen eine erhöhte Apoptoserate *in vitro* (Hamasaki, Sendo et al. 1998).

Außerdem gibt es neuere Befunde, dass die Apoptose in humanen PMN nicht immer mit dem Mcl-1-Proteinlevel invers korreliert. So wurde in PMN aus septischen

Polytrauma-Patienten trotz der verminderten Apoptose die erniedrigte Expression von antiapoptotischen Proteinen Mcl-1 und A1/Bfl1, im Vergleich zu schwerverletzten, nicht septischen Patienten, dokumentiert (Paunel-Gorgulu et al. 2012). Angesichts dessen ist es anzunehmen, dass der Serum-medierte antiapoptotische Effekt sowie die intrinsische Apoptoseresistenz nicht nur durch die Stabilisierung von Mcl-1, sondern auch durch die Modulation weiterer Faktoren in humanen PMN nach schwerem Trauma vermittelt werden.

Das nachfolgende Ziel dieser Arbeit ist daher, die oben beschriebene antiapoptotische Signalkaskade in PMN aus Polytrauma-Patienten näher zu untersuchen, sowie weitere Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die (evtl. ergänzend zur Wirkung von Mcl-1) die verzögerte spontane Apoptose und die intrinsische Apoptoseresistenz gegen STS in PMN nach einem schweren Trauma hervorrufen können.

6 Literatur

- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17**(20): 2481-2495.
- Aga, E., D. M. Katschinski, et al. (2002). "Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*." J Immunol **169**(2): 898-905.
- Akgul, C., D. A. Moulding, et al. (2001). "Molecular control of neutrophil apoptosis." FEBS Lett **487**(3): 318-322.
- Altnauer, F., S. Conus, et al. (2004). "Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis." J Biol Chem **279**(7): 5947-5957.
- Alvarado-Kristensson, M., F. Melander, et al. (2004). "p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils." J Exp Med **199**(4): 449-458.
- Alvarado-Kristensson, M., M. I. Porn-Ares, et al. (2002). "p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis." Faseb J **16**(1): 129-131.
- An, G., G. Nieman, et al. (2012). "Computational and systems biology in trauma and sepsis: current state and future perspectives." Int J Burns Trauma **2**(1): 1-10.
- Andersson, U., H. Wang, et al. (2000). "High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes." J Exp Med **192**(4): 565-570.
- Andina, N., S. Conus, et al. (2009). "Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils." Cell Death Differ **16**(9): 1248-1255.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, et al. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." Crit Care Med **29**(7): 1303-1310.
- Aoshiba, K., S. Yasui, et al. (1999). "Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils." J Immunol **162**(3): 1692-1700.
- Aref, S., D. Abdullah, et al. (2011). "Neutrophil Apoptosis in Neutropenic Patients With Hepatitis C Infection: Role of Caspases 3, 10, and GM-CSF." Indian J Hematol Blood Transfus **27**(2): 81-87.
- Arruda, M. A., A. G. Rossi, et al. (2004). "Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB." J Immunol **173**(3): 2023-2030.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.

- Ayala, A., M. M. Perrin, et al. (1990). "Hemorrhage induces an increase in serum TNF which is not associated with elevated levels of endotoxin." Cytokine **2**(3): 170-174.
- Bae, J., C. P. Leo, et al. (2000). "MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain." J Biol Chem **275**(33): 25255-25261.
- Baelde, H. J., A. M. Cleton-Jansen, et al. (2001). "High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma." J Clin Pathol **54**(10): 778-782.
- Barnhart, B. C., E. C. Alappat, et al. (2003). "The CD95 type I/type II model." Semin Immunol **15**(3): 185-193.
- Bazzoni, F., S. Giovedi, et al. (1999). "Analysis of the Bak protein expression in human polymorphonuclear neutrophils." Int J Clin Lab Res **29**(1): 41-45.
- Belmokhtar, C. A., J. Hillion, et al. (2001). "Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms." Oncogene **20**(26): 3354-3362.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." J Leukoc Biol **81**(1): 1-5.
- Bilevicius, E., D. Dragosavac, et al. (2001). "Multiple organ failure in septic patients." Braz J Infect Dis **5**(3): 103-110.
- Bingle, C. D., R. W. Craig, et al. (2000). "Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death." J Biol Chem **275**(29): 22136-22146.
- Birnie, G. D. (1988). "The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation." Br J Cancer Suppl **9**: 41-45.
- Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-1655.
- Bone, R. C., R. A. Balk, et al. (2009). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992." Chest **136**(5 Suppl).
- Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**(10): 3503-3521.
- Borregaard, N. and T. Herlin (1982). "Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis." J Clin Invest **70**(3): 550-557.

- Borregaard, N., M. Sehested, et al. (1995). "Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation." Blood **85**(3): 812-817.
- Botha, A. J., F. A. Moore, et al. (1995). "Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window." Surgery **118**(2): 358-364.
- Boyer, P. D., B. Chance, et al. (1977). "Oxidative phosphorylation and photophosphorylation." Annu Rev Biochem **46**: 955-966.
- Brach, M. A., S. deVos, et al. (1992). "Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death." Blood **80**(11): 2920-2924.
- Brinkmann, V., U. Reichard, et al. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.
- Brown, S. B. and J. Savill (1999). "Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes." J Immunol **162**(1): 480-485.
- Brunkhorst, F. M. (2006). "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **41**(1): 43-44.
- Byrne, A. and D. J. Reen (2002). "Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils." J Immunol **168**(4): 1968-1977.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-1657.
- Cassatella, M. A. (1999). "Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound." Adv Immunol **73**: 369-509.
- Castedo, M., T. Hirsch, et al. (1996). "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis." J Immunol **157**(2): 512-521.
- Castellheim, A., O. L. Brekke, et al. (2009). "Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis." Scand J Immunol **69**(6): 479-491.
- Chan, G., M. T. Nogalski, et al. (2010). "PI3K-dependent upregulation of Mcl-1 by human cytomegalovirus is mediated by epidermal growth factor receptor and inhibits apoptosis in short-lived monocytes." J Immunol **184**(6): 3213-3222.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signaling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chen, L. B. (1989). "Fluorescent labeling of mitochondria." Methods Cell Biol **29**: 103-123.

- Cheng, E. H., T. V. Sheiko, et al. (2003). "VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis." Science **301**(5632): 513-517.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**(3): 705-711.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, et al. (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." Cell Death Differ **13**(8): 1396-1402.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" Trends Cell Biol **18**(4): 157-164.
- Choi, S. S., I. C. Park, et al. (1995). "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow." Oncogene **11**(9): 1693-1698.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Chuang, P. I., E. Yee, et al. (1998). "A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **249**(2): 361-365.
- Cicco, N. A., A. Lindemann, et al. (1990). "Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha." Blood **75**(10): 2049-2052.
- Clohessy, J. G., J. Zhuang, et al. (2004). "Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells." Br J Haematol **125**(5): 655-665.
- Collins, S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." Blood **70**(5): 1233-1244.
- Collins, S. J., R. C. Gallo, et al. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." Nature **270**(5635): 347-349.
- Colotta, F., F. Re, et al. (1992). "Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products." Blood **80**(8): 2012-2020.
- Cosa, G., K. S. Focsaneanu, et al. (2001). "Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution." Photochem Photobiol **73**(6): 585-599.
- Cossarizza, A., D. Ceccarelli, et al. (1996). "Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level." Exp Cell Res **222**(1): 84-94.
- Cotran, R., Kumar, Collins, T.. (1999). "Robbins pathologic basis of disease. 6th edn. Philadelphia: WB Saunders."

- Cowburn, A. S., K. A. Cadwallader, et al. (2002). "Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival." Blood **100**(7): 2607-2616.
- Cowburn, A. S., A. M. Condliffe, et al. (2008). "Advances in neutrophil biology: clinical implications." Chest **134**(3): 606-612.
- Cowburn, A. S., C. Summers, et al. (2011). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor causes a paradoxical increase in the BH3-only pro-apoptotic protein Bim in human neutrophils." Am J Respir Cell Mol Biol **44**(6): 879-887.
- Coxon, A., T. Tang, et al. (1999). "Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **190**(7): 923-934.
- Craig, R. W. (2002). "MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis." Leukemia **16**(4): 444-454.
- Crawford, J. (2004). Improving the management of chemotherapy-induced neutropenia, J Support Oncol. 2004 Mar-Apr;2(2 Suppl 2):36-9.
- Cross, A., R. C. Bucknall, et al. (2003). "Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(10): 2796-2806.
- Cross, A., R. J. Moots, et al. (2008). "The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1." Blood **111**(2): 878-884.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-789.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." Genes Dev **12**(11): 1551-1570.
- Daher, K. A., M. E. Selsted, et al. (1986). "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins." J Virol **60**(3): 1068-1074.
- Dalton, W. T., Jr., M. J. Ahearn, et al. (1988). "HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3." Blood **71**(1): 242-247.
- Degli Esposti, M., G. Ferry, et al. (2003). "Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3." J Biol Chem **278**(18): 15749-15757.
- Derouet, M., L. Thomas, et al. (2004). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1." J Biol Chem **279**(26): 26915-26921.
- Derouet, M., L. Thomas, et al. (2006). "Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1." J Immunol **176**(2): 957-965.

Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (2001). "Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8." Mol Cell **8**(3): 601-611.

Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 891-901.

Dewas, C., P. M. Dang, et al. (2003). "TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol **171**(8): 4392-4398.

Dibbert, B., M. Weber, et al. (1999). "Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13330-13335.

Dimitriou, I. D., L. Clemenza, et al. (2008). "Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins." Immunol Rev **224**: 265-283.

Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-508.

Ding, Q., X. He, et al. (2007). "Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer." Cancer Res **67**(10): 4564-4571.

Domina, A. M., J. H. Smith, et al. (2000). "Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition." J Biol Chem **275**(28): 21688-21694.

Dorward, D. A., C. D. Lucas, et al. (2012). "Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution." Pharmacol Ther **135**(2): 182-199.

Dragon, S., A. S. Saffar, et al. (2008). "IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils." Mol Immunol **45**(1): 160-168.

Dubrave, D. B., D. R. Spriggs, et al. (1990). "Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6758-6761.

Duffin, R., A. E. Leitch, et al. (2010). "Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies." Immunol Rev **236**: 28-40.

Durham, R. M., J. J. Moran, et al. (2003). "Multiple organ failure in trauma patients." J Trauma **55**(4): 608-616.

Dzhagalov, I., A. St John, et al. (2007). "The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages." Blood **109**(4): 1620-1626.

Edwards, S. W. (1994). "Biochemistry and Physiology of the Neutrophil." Cambridge University Press, New York.

Edwards, S. W., M. Derouet, et al. (2004). "Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 489-492.

Edwards, S. W., V. Hughes, et al. (1988). "Immunological detection of myeloperoxidase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis." Biochem J **250**(1): 81-85.

Edwards, S. W., D. A. Moulding, et al. (2003). "Regulation of neutrophil apoptosis." Chem Immunol Allergy **83**: 204-224.

El Benna, J., J. Han, et al. (1996). "Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK." Arch Biochem Biophys **334**(2): 395-400.

El Benna, J., G. Hayem, et al. (2002). "NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy." Inflammation **26**(6): 273-278.

Elbim, C., P. D. Katsikis, et al. (2009). "Neutrophil apoptosis during viral infections." Open Virol J **3**: 52-59.

Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, et al. (2001). "Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils." J Immunol **166**(12): 7486-7495.

Ertel, W., M. Keel, et al. (1998). "Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation." J Trauma **44**(5): 767-775; discussion 775-766.

Eskes, R., B. Antonsson, et al. (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." J Cell Biol **143**(1): 217-224.

Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**(3): 929-935.

Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.

Ferrari, G., V. Terushkin, et al. (2012). "TGF-beta1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38beta to proapoptotic p38alpha." Mol Cancer Res **10**(5): 605-614.

Fibach, E., T. Peled, et al. (1982). "Modulation of the maturation of human leukemic promyelocytes (HL-60) to granulocytes or macrophages." Leuk Res **6**(6): 781-790.

- Fontana, J. A., D. A. Colbert, et al. (1981). "Identification of a population of bipotent stem cells in the HL60 human promyelocytic leukemia cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3863-3866.
- Fossati, G., R. J. Moots, et al. (2002). "Differential role of neutrophil Fcgamma receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes." Arthritis Rheum **46**(5): 1351-1361.
- Fossati, G., D. A. Moulding, et al. (2003). "The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis." J Immunol **170**(4): 1964-1972.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." Science **275**(5300): 665-668.
- Frasch, S. C., J. A. Nick, et al. (1998). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils." J Biol Chem **273**(14): 8389-8397.
- Frech, M., M. Andjelkovic, et al. (1997). "High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity." J Biol Chem **272**(13): 8474-8481.
- Fulop, T., A. Larbi, et al. (2004). "Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging." Aging Cell **3**(4): 217-226.
- Furze, R. C. and S. M. Rankin (2008). "The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse." Faseb J **22**(9): 3111-3119.
- Gallagher, R., S. Collins, et al. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." Blood **54**(3): 713-733.
- Gao, G. and Q. P. Dou (2000). "N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death." J Cell Biochem **80**(1): 53-72.
- Gardai, S. J., D. A. Hildeman, et al. (2004). "Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils." J Biol Chem **279**(20): 21085-21095.
- Garrison, S. P., J. A. Thornton, et al. (2010). "The p53-target gene puma drives neutrophil-mediated protection against lethal bacterial sepsis." PLoS Pathog **6**(12): 1001240.
- Gasmi, L., A. G. McLennan, et al. (1996). "The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation." Blood **87**(8): 3442-3449.
- Geering, B., U. Gurzeler, et al. (2011). "A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils." Blood **117**(22): 5953-5962.

- Giam, M., D. C. Huang, et al. (2008). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." Oncogene **27**(1): 50.
- Gomez-Bougie, P., R. Bataille, et al. (2005). "Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells." Eur J Immunol **35**(3): 971-976.
- Gomez-Bougie, P., S. Wuilleme-Toumi, et al. (2007). "Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma." Cancer Res **67**(11): 5418-5424.
- Gosselin, E. J., K. Wardwell, et al. (1993). "Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3." J Immunol **151**(3): 1482-1490.
- Graham, S. V., R. W. Tindle, et al. (1985). "Variation in myc gene amplification and expression in sublines of HL60 cells." Leuk Res **9**(2): 239-247.
- Green, D. R. (1998). "Apoptotic pathways: the roads to ruin." Cell **94**(6): 695-698.
- Grinberg, M., R. Sarig, et al. (2002). "tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis." J Biol Chem **277**(14): 12237-12245.
- Grobmyer, S. R., E. Lin, et al. (2000). "Elevation of IL-18 in human sepsis." J Clin Immunol **20**(3): 212-215.
- Guimaraes-Costa, A. B., M. T. Nascimento, et al. (2009). "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(16): 6748-6753.
- Guzik, K., J. Skret, et al. (2011). "Cigarette smoke-exposed neutrophils die unconventionally but are rapidly phagocytosed by macrophages." Cell Death Dis **17**(2): 13.
- Hallett, M. B. and D. Lloyds (1995). "Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'." Immunol Today **16**(6): 264-268.
- Hamasaki, A., F. Sendo, et al. (1998). "Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene." J Exp Med **188**(11): 1985-1992.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle, et al. (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." Blood **92**(9): 3007-3017.
- Hannah, S., K. Mecklenburgh, et al. (1995). "Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro." FEBS Lett **372**(2-3): 233-237.
- Harter, L., M. Keel, et al. (2002). "Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis." Shock **18**(5): 401-406.
- Hashimoto, F., T. Horigome, et al. (1983). "An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel." Anal Biochem **129**(1): 192-199.

- Haugland, R. P. (2001). "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 8th edn. Molecular Probes, Inc., Eugene, OR."
- Hayashi, F., T. K. Means, et al. (2003). "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function." Blood **102**(7): 2660-2669.
- Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-994.
- Hellmich, B., E. Csernok, et al. (2002). "Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **46**(9): 2384-2391.
- Henson, E. S., X. Hu, et al. (2006). "Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 845-853.
- Hernandez, L. A., M. B. Grisham, et al. (1987). "Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury." Am J Physiol **253**(3 Pt 2): H699-703.
- Herold, M. J., J. Zeitz, et al. (2006). "The stability and anti-apoptotic function of A1 are controlled by its C terminus." J Biol Chem **281**(19): 13663-13671.
- Hewins, P., M. D. Morgan, et al. (2006). "IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis." Kidney Int **69**(3): 605-615.
- Hietbrink, F., L. Koenderman, et al. (2006). "Trauma: the role of the innate immune system." World J Emerg Surg **1**: 15.
- Hirata, J., J. Kotani, et al. (2008). "A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis." Shock **30**(6): 628-633.
- Holzappel, B. a. W. L. (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)." Biologie unserer Zeit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.(2 (37)): 120-126.
- Hotta, K., M. Niwa, et al. (2001). "The loss of susceptibility to apoptosis in exudated tissue neutrophils is associated with their nuclear factor-kappa B activation." Eur J Pharmacol **433**(1): 17-27.
- Hoyert, D. L., M. P. Heron, et al. (2006). "Deaths: final data for 2003." Natl Vital Stat Rep **54**(13): 1-120.
- Ignacchiti, M. D., R. Sesti-Costa, et al. (2011). "Effect of academic psychological stress in post-graduate students: the modulatory role of cortisol on superoxide release by neutrophils." Stress **14**(3): 290-300.
- Inoshita, S., K. Takeda, et al. (2002). "Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress." J Biol Chem **277**(46): 43730-43734.

- Jimenez, M. F., R. W. Watson, et al. (1997). "Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome." Arch Surg **132**(12): 1263-1269.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, et al. (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4997-5002.
- Karnovsky, M. L. (1968). "The metabolism of leukocytes." Semin Hematol **5**(2): 156-165.
- Kato, T., H. Kutsuna, et al. (2006). "Cyclic AMP delays neutrophil apoptosis via stabilization of Mcl-1." FEBS Lett **580**(19): 4582-4586.
- Keel, M., U. Ungethum, et al. (1997). "Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis." Blood **90**(9): 3356-3363.
- Kellum, J. A., L. Kong, et al. (2007). "Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study." Arch Intern Med **167**(15): 1655-1663.
- Khanfer, R., A. C. Phillips, et al. (2010). "Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress." Psychosom Med **72**(7): 636-640.
- Kjeldsen, L., O. W. Bjerrum, et al. (1992). "Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules." Biochem J **287**(Pt 2): 603-610.
- Klein, D. (2002). "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations." Trends Mol Med **8**(6): 257-260.
- Klein, J. B., M. J. Rane, et al. (2000). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways." J Immunol **164**(8): 4286-4291.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-1136.
- Kotone-Miyahara, Y., K. Yamashita, et al. (2004). "Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C." J Leukoc Biol **76**(5): 1047-1056.
- Kozopas, K. M., T. Yang, et al. (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3516-3520.
- Kubista, M., B. Akerman, et al. (1987). "Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy." Biochemistry **26**(14): 4545-4553.

- Kumar, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 533-538.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-342.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lapinet, J. A., P. Scapini, et al. (2000). "Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles." Infect Immun **68**(12): 6917-6923.
- Larbi, A., N. Douziech, et al. (2005). "The role of the MAPK pathway alterations in GM-CSF modulated human neutrophil apoptosis with aging." Immun Ageing **2**(1): 6.
- Lee, A., M. K. Whyte, et al. (1993). "Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators." J Leukoc Biol **54**(4): 283-288.
- Lee, E., T. Lindo, et al. (1999). "Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors." Am J Respir Crit Care Med **160**(6): 2079-2085.
- Lee, E. F., P. E. Czabotar, et al. (2008). "A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation." J Cell Biol **180**(2): 341-355.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-746.
- Lenz, A., G. A. Franklin, et al. (2007). "Systemic inflammation after trauma." Injury **38**(12): 1336-1345.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-192.
- Leuenroth, S. J., P. S. Grutkoski, et al. (2000). "The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis." J Leukoc Biol **68**(1): 158-166.
- Levy, M. M., M. P. Fink, et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.
- Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.

- Ligthart, G. J., J. X. Corberand, et al. (1990). "Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol." Mech Ageing Dev **55**(1): 89-105.
- Liles, W. C., P. A. Kiener, et al. (1996). "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils." J Exp Med **184**(2): 429-440.
- Lin, E. Y., A. Orlofsky, et al. (1993). "Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2." J Immunol **151**(4): 1979-1988.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lomonosova, E. and G. Chinnadurai (2008). "BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview." Oncogene **27**(1): 39.
- Lord, P. C., L. M. Wilmoth, et al. (1991). "Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes." J Clin Invest **87**(4): 1312-1321.
- Lucas, C. D., K. C. Allen, et al. (2012). "Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway." Faseb J **29**: 29.
- Lucas, C. D., K. C. Allen, et al. (2013). "Flavones induce neutrophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1 via a proteasomal-dependent pathway." Faseb J **27**(3): 1084-1094.
- Luo, H. R. and F. Loison (2008). "Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation." Am J Hematol **83**(4): 288-295.
- Maekawa, K., S. Futami, et al. (1998). "Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b." J Trauma **44**(3): 460-468.
- Maianski, N. A., J. Geissler, et al. (2004). "Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis." Cell Death Differ **11**(2): 143-153.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, et al. (2004). "Apoptosis of neutrophils." Acta Haematol **111**(1-2): 56-66.
- Maianski, N. A., D. Roos, et al. (2004). "Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor." J Immunol **172**(11): 7024-7030.
- Malech, H. L. and J. I. Gallin (1987). "Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases." N Engl J Med **317**(11): 687-694.
- Mandal, M., C. Borowski, et al. (2005). "The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival." J Exp Med **201**(4): 603-614.

- Mantovani, A., M. A. Cassatella, et al. (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **11**(8): 519-531.
- Marik, P. E. and M. Flemmer (2012). "The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment." J Trauma Acute Care Surg **73**(4): 801-808.
- Marte, B. M. and J. Downward (1997). "PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond." Trends Biochem Sci **22**(9): 355-358.
- Martin, C., P. C. Burdon, et al. (2003). "Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence." Immunity **19**(4): 583-593.
- Martin, T. R. (1999). "Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture." Chest **116**(1 Suppl): 2S-8S.
- Matute-Bello, G., W. C. Liles, et al. (1997). "Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **156**(6): 1969-1977.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.
- Maurer, U., C. Charvet, et al. (2006). "Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1." Mol Cell **21**(6): 749-760.
- Mayadas, T. N. and X. Cullere (2005). "Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions." Trends Immunol **26**(7): 388-395.
- McColl, S. R., D. Beauseigle, et al. (1990). "Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha involves regulation at a post-cell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins." J Immunol **145**(9): 3047-3053.
- Michels, J., P. W. Johnson, et al. (2005). "Mcl-1." Int J Biochem Cell Biol **37**(2): 267-271.
- Michels, J., J. W. O'Neill, et al. (2004). "Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage." Oncogene **23**(28): 4818-4827.
- Minchinton, R. M. and A. H. Waters (1985). Autoimmune thrombocytopenia and neutropenia after bone marrow transplantation, Blood. 1985 Sep;66(3):752.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Moore, F. A., A. Sauaia, et al. (1996). "Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon." J Trauma **40**(4): 501-510.

- Mooren, F. C., K. Volker, et al. (2012). "Exercise delays neutrophil apoptosis by a G-CSF-dependent mechanism." J Appl Physiol **113**(7): 1082-1090.
- Mori, Y., M. Higuchi, et al. (2004). "Adenosine A2A receptor facilitates calcium-dependent protein secretion through the activation of protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase in PC12 cells." Cell Struct Funct **29**(4): 101-110.
- Moulding, D. A., C. Akgul, et al. (2001). "BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis." J Leukoc Biol **70**(5): 783-792.
- Moulding, D. A., R. V. Giles, et al. (2000). "Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells." Blood **96**(5): 1756-1763.
- Mülhardt, C. (2006). "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 5. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Elsevier GmbH, Heidelberg."
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Murphy, B. M., A. J. O'Neill, et al. (2003). "The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C." J Exp Med **197**(5): 625-632.
- Murray, J., J. A. Barbara, et al. (1997). "Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro." Blood **90**(7): 2772-2783.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." J Biol Chem **273**(5): 2926-2930.
- Nahas, N., T. F. Molski, et al. (1996). "Tyrosine phosphorylation and activation of a new mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade in human neutrophils stimulated with various agonists." Biochem J **318**(Pt 1): 247-253.
- Nakamae-Akahori, M., T. Kato, et al. (2006). "Enhanced neutrophil motility by granulocyte colony-stimulating factor: the role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase." Immunology **119**(3): 393-403.
- Nam, D. K., S. Lee, et al. (2002). "Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6152-6156.
- Namas, R., R. Zamora, et al. (2012). "Sepsis: Something old, something new, and a systems view." J Crit Care **27**(3): 27.
- Napoli, C., C. Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." Nat Rev Immunol **6**(3): 173-182.

- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Nick, J. A., N. J. Avdi, et al. (1996). "Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide." J Immunol **156**(12): 4867-4875.
- Nick, J. A., N. J. Avdi, et al. (1999). "Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils." J Clin Invest **103**(6): 851-858.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-279.
- Nijhawan, D., M. Fang, et al. (2003). "Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation." Genes Dev **17**(12): 1475-1486.
- Nijhuis, E., J. W. Lammers, et al. (2002). "Src kinases regulate PKB activation and modulate cytokine and chemoattractant-controlled neutrophil functioning." J Leukoc Biol **71**(1): 115-124.
- Novotny, A. R., D. Reim, et al. (2012). "Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis." Immunobiology **217**(6): 616-621.
- Nusse, O., L. Serrander, et al. (1998). "Ca²⁺-induced exocytosis in individual human neutrophils: high- and low-affinity granule populations and submaximal responses." Embo J **17**(5): 1279-1288.
- Oberholzer, A., U. Steckholzer, et al. (2001). "Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients." Shock **16**(6): 411-414.
- Ogura, H., H. Tanaka, et al. (1999). "Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients." J Trauma **46**(5): 774-781.
- Ogura, H., H. Tanaka, et al. (1999). "Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients." J Trauma **46**(5): 774-781; discussion 781-773.
- Oltvai, Z. N., C. L. Millman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.
- Osuchowski, M. F., K. Welch, et al. (2006). "Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality." J Immunol **177**(3): 1967-1974.
- Ottonello, L., R. Gonella, et al. (1998). "Prostaglandin E2 inhibits apoptosis in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: role of intracellular cyclic AMP levels." Exp Hematol **26**(9): 895-902.
- Parks, K. R. and J. M. Davis (2012). "Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil." Surg Infect **13**(5): 300-306.

- Partrick, D. A., F. A. Moore, et al. (1996). "Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure." New Horiz **4**(2): 194-210.
- Patton, G. C., C. Coffey, et al. (2009). "Global patterns of mortality in young people: a systematic analysis of population health data." Lancet **374**(9693): 881-892.
- Paunel-Gorgulu, A., T. Kirichevska, et al. (2012). "Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis." Mol Med **18**: 325-335.
- Paunel-Gorgulu, A., T. Logters, et al. (2011). "Stimulation of Fas signaling down-regulates activity of neutrophils from major trauma patients with SIRS." Immunobiology **216**(3): 334-342.
- Paunel-Gorgulu, A., M. Zornig, et al. (2009). "Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation." J Immunol **183**(10): 6198-6206.
- Perez, H. D., S. Marder, et al. (1987). "Human neutrophils contain subpopulations of specific granules exhibiting different sensitivities to changes in cytosolic free calcium." Biochem Biophys Res Commun **145**(2): 976-981.
- Petit, P. X., H. Lecoer, et al. (1995). "Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis." J Cell Biol **130**(1): 157-167.
- Pettit, E. J. and M. B. Hallett (1994). "Neutrophil activation and priming during engagement of CD11b/CD18 integrins." Biochem Soc Trans **22**(3).
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9).
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9).
- Phillips, A. C., D. Carroll, et al. (2006). "Stressful life events are associated with low secretion rates of immunoglobulin A in saliva in the middle aged and elderly." Brain Behav Immun **20**(2): 191-197.
- Pillay, J., I. den Braber, et al. (2010). "In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days." Blood **116**(4): 625-627.
- Plackett, T. P., E. D. Boehmer, et al. (2004). "Aging and innate immune cells." J Leukoc Biol **76**(2): 291-299.
- Pollack, A. (1990). "Flow cytometric cell-kinetic analysis by simultaneously staining nuclei with propidium iodide and fluorescein isothiocyanate." Methods Cell Biol **33**: 315-323.

- Poot, M., Y. Z. Zhang, et al. (1996). "Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains." J Histochem Cytochem **44**(12): 1363-1372.
- Pryde, J. G., A. Walker, et al. (2000). "Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c." J Biol Chem **275**(43): 33574-33584.
- Quint, J. K. and J. A. Wedzicha (2007). "The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease." J Allergy Clin Immunol **119**(5): 1065-1071.
- Ramirez, M. J., E. Titos, et al. (2004). "Increased apoptosis dependent on caspase-3 activity in polymorphonuclear leukocytes from patients with cirrhosis and ascites." J Hepatol **41**(1): 44-48.
- Rane, M. J., P. Y. Coxon, et al. (2001). "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils." J Biol Chem **276**(5): 3517-3523.
- Raza, K., D. Scheel-Toellner, et al. (2006). "Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **8**(4).
- Reers, M., T. W. Smith, et al. (1991). "J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential." Biochemistry **30**(18): 4480-4486.
- Renshaw, S. A., J. S. Parmar, et al. (2003). "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL." J Immunol **170**(2): 1027-1033.
- Renshaw, S. A., S. J. Timmons, et al. (2000). "Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor." J Leukoc Biol **67**(5): 662-668.
- Reynolds, J. E., T. Yang, et al. (1994). "Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells." Cancer Res **54**(24): 6348-6352.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." Nat Protoc **1**(3): 1458-1461.
- Ronco, C., R. Bellomo, et al. (2003). Sepsis--theory and therapies, N Engl J Med. 2003 Apr 17;348(16):1600-2; author reply 1600-2.
- Rossi, A. G., J. M. Cousin, et al. (1995). "Agents that elevate cAMP inhibit human neutrophil apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **217**(3): 892-899.
- Sabroe, I., E. C. Jones, et al. (2002). "Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses." J Immunol **168**(9): 4701-4710.

- Saffar, A. S., S. Dragon, et al. (2008). "Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils." J Allergy Clin Immunol **121**(2): 492-498.
- Saldanha-Gama, R. F., J. A. Moraes, et al. (2010). "alpha(9)beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members." Biochim Biophys Acta **7**: 848-857.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual (2nd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY."
- Santos-Beneit, A. M. and F. Mollinedo (2000). "Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells." J Leukoc Biol **67**(5): 712-724.
- Sassone-Corsi, P. (2012). "The cyclic AMP pathway." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).
- Savill, J. (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Br Med Bull **53**(3): 491-508.
- Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.
- Savill, J. and C. Haslett (1995). "Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation." Semin Cell Biol **6**(6): 385-393.
- Savill, J. S., A. H. Wyllie, et al. (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-875.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-1687.
- Scaffidi, P., T. Misteli, et al. (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-195.
- Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, et al. (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Scheel-Toellner, D., K. Wang, et al. (2004). "Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis." Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 679-681.
- Schmittgen, T. D. Real-time quantitative PCR, Methods. 2001 Dec;25(4):383-5.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.

- Schwickart, M., X. Huang, et al. (2010). "Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival." Nature **463**(7277): 103-107.
- Segal, A. W. (1989). "The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease." J Clin Invest **83**(6): 1785-1793.
- Seidelin, J. B., O. H. Nielsen, et al. (2002). "Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis." Intensive Care Med **28**(11): 1613-1618.
- Sengelov, H., L. Kjeldsen, et al. (1993). "Control of exocytosis in early neutrophil activation." J Immunol **150**(4): 1535-1543.
- Servant, G., O. D. Weiner, et al. (2000). "Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis." Science **287**(5455): 1037-1040.
- Sherwood, E. R. a. T. D. L. (2002). "The systemic inflammatory response syndrome " Herndon D. Editor. Total burn care. Philadelphia: WB Saunders.: 257-270.
- Shimizu, S., Y. Eguchi, et al. (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." Oncogene **13**(1): 21-29.
- Simmons, M. J., G. Fan, et al. (2008). "Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist." Oncogene **27**(10): 1421-1428.
- Simon, H. U. (2003). "Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation." Immunol Rev **193**: 101-110.
- Slee, E. A., S. A. Keogh, et al. (2000). "Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release." Cell Death Differ **7**(6): 556-565.
- Smiley, S. T., M. Reers, et al. (1991). "Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3671-3675.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Squier, M. K., A. J. Sehnert, et al. (1995). "Apoptosis in leukocytes." J Leukoc Biol **57**(1): 2-10.
- Suratt, B. T., S. K. Young, et al. (2001). "Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(4): L913-921.
- Suzuki, K., M. Hino, et al. (1999). "Cytokine-specific activation of distinct mitogen-activated protein kinase subtype cascades in human neutrophils stimulated by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor-alpha." Blood **93**(1): 341-349.

- Swain, S. D., T. T. Rohn, et al. (2002). "Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents." Antioxid Redox Signal **4**(1): 69-83.
- Takahashi, M., M. Miyashita, et al. (2013). "Low-volume exercise training attenuates oxidative stress and neutrophils activation in older adults." Eur J Appl Physiol **113**(5): 1117-1126.
- Tanaka, H., K. Ishikawa, et al. (1996). "Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentration in patients with trauma and sepsis." J Trauma **40**(5): 718-725.
- Taneja, R., J. Parodo, et al. (2004). "Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity." Crit Care Med **32**(7): 1460-1469.
- Tang, D., J. M. Lahti, et al. (2000). "Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis." J Biol Chem **275**(13): 9303-9307.
- Territo, M. C., T. Ganz, et al. (1989). "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils." J Clin Invest **84**(6): 2017-2020.
- Thallinger, C., M. F. Wolschek, et al. (2004). "Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4185-4191.
- Theander, S., D. P. Lew, et al. (2002). "Granule-specific ATP requirements for Ca²⁺-induced exocytosis in human neutrophils. Evidence for substantial ATP-independent release." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2975-2983.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-1462.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." Biotechnology **24**: 145-149.
- van Buul, J. D., M. J. Allingham, et al. (2007). "RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration." J Cell Biol **178**(7): 1279-1293.
- van der Krol, A. R., L. A. Mur, et al. (1990). "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." Plant Cell **2**(4): 291-299.
- Van Der Vliet, H. J., P. C. Wever, et al. (1997). "Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to

- susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis." Clin Exp Immunol **110**(2): 324-328.
- van Griensven, M., M. Stalp, et al. (1999). "Ischemia-reperfusion directly increases pulmonary endothelial permeability in vitro." Shock **11**(4): 259-263.
- van Raam, B. J., W. Sluiter, et al. (2008). "Mitochondrial membrane potential in human neutrophils is maintained by complex III activity in the absence of supercomplex organisation." PLoS One **3**(4): e2013.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-442.
- Villunger, A., L. A. O'Reilly, et al. (2000). "Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes." J Exp Med **192**(5): 647-658.
- Vincent, J. L. and E. Abraham (2006). "The last 100 years of sepsis." Am J Respir Crit Care Med **173**(3): 256-263.
- Wallen, C. A., R. Higashikubo, et al. (1982). "Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA--acridine orange and propidium iodide." Cytometry **3**(3): 155-160.
- Walmsley, S. R., A. S. Cowburn, et al. (2004). "Characterization of the survival effect of tumour necrosis factor-alpha in human neutrophils." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 456-460.
- Wang, S., M. B. Voisin, et al. (2006). "Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils." J Exp Med **203**(6): 1519-1532.
- Ward, C., E. R. Chilvers, et al. (1999). "NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro." J Biol Chem **274**(7): 4309-4318.
- Wardle, D. J., J. Burgon, et al. (2011). "Effective caspase inhibition blocks neutrophil apoptosis and reveals Mcl-1 as both a regulator and a target of neutrophil caspase activation." PLoS One **6**(1): 0015768.
- Waring, P. (1990). "DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels." J Biol Chem **265**(24): 14476-14480.
- Waydhas, C., D. Nast-Kolb, et al. (1992). "Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma." Arch Surg **127**(4): 460-467.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.
- Wei, S., J. H. Liu, et al. (1996). "Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol **157**(11): 5155-5162.

- Weinmann, P., P. Gaehtgens, et al. (1999). "Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3." Blood **93**(9): 3106-3115.
- Weiss, S. J. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." N Engl J Med **320**(6): 365-376.
- Westphal, D., G. Dewson, et al. (2011). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." Biochim Biophys Acta **4**: 521-531.
- Whitlock, B. B., S. Gardai, et al. (2000). "Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms." J Cell Biol **151**(6): 1305-1320.
- Windsor, A. C., P. G. Mullen, et al. (1993). "Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome." Br J Surg **80**(1): 10-17.
- Wipke, B. T. and P. M. Allen (2001). "Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis." J Immunol **167**(3): 1601-1608.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, et al. (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1): 130-131.
- Wolter, K. G., Y. T. Hsu, et al. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**(5): 1281-1292.
- Wong, S. H., N. Francis, et al. (2009). "Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid." Rheumatology **48**(1): 39-44.
- Woodfin, A., M. B. Voisin, et al. (2009). "Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1." Blood **113**(24): 6246-6257.
- Wright, H. L., R. J. Moots, et al. (2010). "Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases." Rheumatology **49**(9): 1618-1631.
- Wuilleme-Toumi, S., V. Trichet, et al. (2007). "Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome degradation." Biochem Biophys Res Commun **361**(4): 865-869.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." Nature **284**(5756): 555-556.
- Xu, Y., F. Loison, et al. (2010). "Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 2950-2955.
- Xue, L. Y., S. M. Chiu, et al. (2003). "Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions." Exp Cell Res **283**(2): 135-145.
- Yamaki, K., J. Hong, et al. (2002). "Participation of various kinases in staurosporine induced apoptosis of RAW 264.7 cells." J Pharm Pharmacol **54**(11): 1535-1544.

- Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." Cell **80**(2): 285-291.
- Yang, L., R. M. Froio, et al. (2005). "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow." Blood **106**(2): 584-592.
- Yang, T., H. L. Buchan, et al. (1996). "MCL-1, a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation." J Cell Physiol **166**(3): 523-536.
- Yao, Y. M., H. Redl, et al. (1998). "The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure." Inflamm Res **47**(5): 201-210.
- Yethon, J. A., R. F. Epand, et al. (2003). "Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis." J Biol Chem **278**(49): 48935-48941.
- Yin, X. M., Z. N. Oltvai, et al. (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax." Nature **369**(6478): 321-323.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Yousefi, S., C. Mihalache, et al. (2009). "Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps." Cell Death Differ **16**(11): 1438-1444.
- Zamzami, N., P. Marchetti, et al. (1995). "Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo." J Exp Med **181**(5): 1661-1672.
- Zamzami, N., S. A. Susin, et al. (1996). "Mitochondrial control of nuclear apoptosis." J Exp Med **183**(4): 1533-1544.
- Zha, H., C. Aime-Sempe, et al. (1996). "Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2." J Biol Chem **271**(13): 7440-7444.
- Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." Cell **87**(4): 619-628.
- Zha, J., S. Weiler, et al. (2000). "Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis." Science **290**(5497): 1761-1765.
- Zhang, J., J. He, et al. (2012). "Delayed apoptosis by neutrophils from COPD patients is associated with altered Bak, Bcl-xl, and Mcl-1 mRNA expression." Diagn Pathol **7**(65): 1746-1596.

- Zhang, X. D., S. K. Gillespie, et al. (2004). "Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways." Mol Cancer Ther **3**(2): 187-197.
- Zhao, Y., B. J. Altman, et al. (2007). "Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1." Mol Cell Biol **27**(12): 4328-4339.
- Zhong, Q., W. Gao, et al. (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis." Cell **121**(7): 1085-1095.
- Zhou, J., Y. Chen, et al. (1998). "The protein expression of Bcl-2, Bax, Fas/Apo-1 in acute myeloid leukemia." J Tongji Med Univ **18**(1): 42-45.
- Zhou, P., N. B. Levy, et al. (2001). "MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes." Blood **97**(12): 3902-3909.
- Zhu, Y., B. J. Swanson, et al. (2004). "Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7681-7686.
- Zipper, H., H. Brunner, et al. (2004). "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications." Nucleic Acids Res **32**(12).

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACCP	amerikanisches Kollegium der Lungenspezialisten (<i>american college of chest physician</i>)
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B (PKB)
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	All-trans-Retinolsäure
Bad	Bcl-2–assoziiertes <i>death promoter</i> Protein
Bak	Bcl-2 Antagonist/ <i>killer</i> Protein
Bax	Bcl-2–assoziiertes X Protein
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x	<i>B-cell lymphoma</i> Protein
Bcl-x _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> Protein
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	Bcl-2 Interaktions-Protein
Bik	Bcl-2 Interaktions- <i>killer</i> Protein
Bim	Bcl-2 Interaktions-Mediator des Zelltodes
bp	Basenpaar
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARS	Kompensatorisches antiinflammatorisches Reaktions-Syndrom (<i>compensatory antiinflammatory response</i>)
CD	Unterscheidungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy-DNA</i>)
cm	Centimeter
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)

CT	Schwellenwert-Zyklus (<i>threshold cycle</i>)
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
Da	Dalton
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIABLO	<i>Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige (<i>double-stranded</i>) RNA
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescent-activated cell sorting</i>)
FADD	<i>Fas-associated death domain-protein</i>
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunde (<i>hour</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HtrA2/Omi	<i>High temperature requirement protein A2</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICU	Intensivstation (<i>intensive care unit</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
ISS	Schweregrad einer Verletzung (<i>injury severity score</i>)
JAK/STAT	<i>Januskinase/signal transducers and activators of transcription</i>
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
JC-1	5,5',6,6' tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid

JNK	C-Jun N-terminale Kinase
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MACS	Magnetische Zellisolierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARS	Komplexes gegenseitiges Reaktions-Syndrom (<i>mixed antagonist response syndrome</i>)
Mcl-1	<i>Myeloid-cell leukemia 1</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
mind.	Mindestens
MK2	MAP Kinase-aktivierte Proteinkinase 2
mL	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
mmHg	Maßeinheit Millimeter Quecksilbersäule (= 133,322 Pascal)
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MnSOD	Mitochondriale Superoxiddismutase
MODS	Multiples Organ-Dysfunktions-Syndrom
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MOV	Multiples Organversagen
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
MSK2	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase 2
MULE	Mcl-1 Ubiquitinylierungs-Ligase E3
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	Neutrophile extrazelluläre Fallen (<i>neutrophil extracellular traps</i>)
ng	Nanogramm
NGF	Nerven Wachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)

NGS	Normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
nM	Nanomol
nm	Nanometer
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PECAM-1	<i>Platelet endothelial-cell adhesion molecule 1</i>
PEST	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin Sequenz
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3/PIP2	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat / -3,4-biphosphat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
Puma	<i>Mitochondrion/p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz (<i>RNA silencing</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (U/min)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- oder <i>Real-Time</i> PCR
SCCM	Gesellschaft der Intensivmedizin (<i>society of critical care medicine</i>)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signaling</i>
sog.	Sogenannt
STS	Staurosporin

Tab.	Tabelle
tBax	gespaltenes (<i>truncated</i>) Bax
tBid	gespaltenes (<i>truncated</i>) Bid
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	Unit
ÜN	über Nacht
USA	Die Vereinigten Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
USP9X	Ubiquitin-spezifische Peptidase 9, <i>X-linked</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Das aktuelle Paradigma der Pathogenese des systemischen inflammatorischen Reaktions-Syndroms (SIRS), des kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktions-Syndroms (CARS) und des multiplen Organversagens (MOV) nach einem Trauma.....	2
Abbildung 1.2. Funktionen und Produkte der PMN, die die Entzündungsprozesse im Organismus aktiv anregen können.....	7
Abbildung 1.3. Die schematische Darstellung des intrinsischen und des extrinsischen apoptotischen	11
Abbildung 1.4. Die Proteine der Bcl-2 Familie werden aufgrund der Zusammensetzung der relativen Bcl-2 Homologie (BH)-Domänen in drei funktionelle Gruppen unterteilt.	13
Abbildung 1.5. Die drei wichtigsten Fraktionen der Bcl-2 Familie in humanen PMN..	14
Abbildung 3.1. Zentrifugenröhrchen vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation von Percoll-Lösung mit Vollblut.	33
Abbildung 4.1. Erhöhte Mengen von phosphorylierten Kinasen in PMN aus Polytrauma-Patienten, isoliert am 1. Tag nach Trauma (Patienten-PMN), im Vergleich zu PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN).	52
Abbildung 4.2. Inhibitoren für PI3K und p38 hemmen den antiapoptotischen Effekt vom Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum) in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen.	54
Abbildung 4.3. Mcl-1 mRNA-Expression nach Behandlung der ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).	55
Abbildung 4.4. Mcl-1-Proteinexpression nach Behandlung der ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).	56
Abbildung 4.5. Anteil der apoptotischen Zellen nach Inkubation von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Inkubation von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.	57

Abbildung 4.6. Mcl-1-Proteinexpression nach Behandlung von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Behandlung von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.	59
Abbildung 4.7. Depolarisation der mitochondrialen Außenmembran nach Inkubation von PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38 in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum), sowie nach Behandlung von PMN aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN) mit den Inhibitoren für PI3K und p38.....	60
Abbildung 4.8. Effekt von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).	63
Abbildung 4.9. Effekt vom anti-Fas IgM Antikörper in Anwesenheit von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).	65
Abbildung 4.10. Effekt von Staurosporin (STS) in Anwesenheit von Inhibitoren für Caspasen (BocD) und Proteasom (MG-132) auf das MMP (A), Mcl-1-Proteinexpression (B) und Apoptose (C) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).	67
Abbildung 4.11. Effekt von Staurosporin (STS) auf das phospho-Akt-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).	69
Abbildung 4.12. Effekt von Staurosporin (STS) auf das phospho-GSK-3 α -Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).	70
Abbildung 4.13. Effekt von Staurosporin (STS) auf das phospho-GSK-3 β -Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN), inkubiert in Ab- und Anwesenheit von Serum der Polytrauma-Patienten (Patienten-Serum).	71
Abbildung 4.14. STS-Resistenz in ausdifferenzierten Neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen nach spezifischer Ausschaltung des Mcl-1-Proteins mittels siRNA.	73
Abbildung 4.15. STS-Resistenz in PMN aus Polytrauma-Patienten nach spezifischer Ausschaltung des Mcl-1-Proteins mittels siRNA.	74

Abbildung 4.16. A - Co-Immunpräzipitation (Co-IP) von Bax, Bid, Bad und Bik mit Mcl-1 in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN). B - Die reziproke Co-IP von Mcl-1 mit Bax in PMN aus gesunden Probanden.	75
Abbildung 4.17. Subzelluläre Lokalisation von Bax, Bid und Cytochrom <i>c</i> (Cyt <i>c</i>) in PMN aus gesunden Probanden (Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (Patienten-PMN).	77
Abbildung 4.18. Densitometrische Auswertungen der Bax/tBax-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A, B - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (C, D - Patienten-PMN).	78
Abbildung 4.19. Subzelluläre Lokalisation von Bax in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und in PMN aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).	80
Abbildung 4.20. Densitometrische Auswertungen der Bid-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).	82
Abbildung 4.21. Densitometrische Auswertungen der Cytochrom <i>c</i> (Cyt <i>c</i>)-Proteinexpression in PMN aus gesunden Probanden (A - Kontroll-PMN) und aus Polytrauma-Patienten (B - Patienten-PMN).	83
Abbildung 5.1. Die <i>bis dato</i> unbekannte Faktoren im Serum von Polytrauma-Patienten induzieren den antiapoptotischen Signalweg in humanen PMN und bewirken eine Verzögerung der Apoptose (schematische Darstellung).	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1. Granula und die Inhalte der Granula von PMN.	4
Tabelle 3.1. Übersicht der primären und sekundären Antikörper für Western Blot.	27
Tabelle 3.2. Übersicht der Antikörper für Co-Immunpräzipitation.	27
Tabelle 3.3. Übersicht der Antikörper für Immunfluoreszenz.	27
Tabelle 3.4. Die Verdünnungen und die Inkubationsparameter für die primären Antikörper.	45

Danksagung

Die Arbeit wurde von März 2010 bis September 2013 im Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie (Klinikdirektor – Prof. Dr. Joachim Windolf, Forschungsleiter – Prof. Dr. Christoph V. Suschek) an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Joachim Windolf, Prof. Dr. Christoph V. Suschek und Frau PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie durchführen zu können, für Förderung und wissenschaftliche Unterstützung ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Sascha Flohé und Frau PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü bin ich für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas sowie für die Begutachtung dieser Arbeit besonders dankbar. Außerdem danke ich Frau PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü für die kompetente Betreuung meiner Arbeit, für stete Diskussionsbereitschaft, gute Ratschläge sowie Unterstützung und Motivation.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. William Frank Martin für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken.

Frau Samira Seghrouchni und Frau Jutta Schneider danke ich für stete Hilfsbereitschaft und viele wertvollen praktischen Tipps und Tricks. Für außerordentlich freundschaftliche Atmosphäre und gemeinsame nette Pausen bedanke ich mich ganz herzlich bei jetzigen und ehemaligen Arbeitskollegen. Unser gemeinsames Frühstück ist nahezu zu einem Ritual geworden und war für mich ein guter Start in den Tag!

Frau Dr. Katrin Frauenstein gilt mein Dank für kritisches Lesen und Korrektur dieser Arbeit.

Natürlich geht mein besonderer Dank auch an alle freiwilligen Blutspender.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinem Mann Sascha für seine große Geduld bedanken, dass du mich in allem unterstützt und immer für mich da bist!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bis jetzt keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Tamara Hornstein

Düsseldorf, den 01.10.2013