

Aus der Klinik für Unfall- & Handchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf

Proteomische Analyse von Serum aus polytraumatisierten Patienten:  
Identifizierung von Serumfaktoren die eine intrinsische Apoptoseresistenz  
in neutrophilen Granulozyten induzieren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Theresia Catharina Sarabhai

2016

Der genaue Text der 2. Seite wird mit der Druckgenehmigung mitgeteilt.

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referentin: PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü

Koreferent: Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

---

*Für meine inspirierenden Eltern,*  
**Martina & Victor**

## Zusammenfassung

Zirkulierende polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind essentiell als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene im Organismus. Eine Gewebeschädigung in Folge eines Traumas führt zur sofortigen Aktivierung der PMN. Nach einem schweren Trauma werden proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren in hohen Konzentrationen freigesetzt, die eine verlängerte Lebensspanne und Funktionalität der PMN bewirken. Am Ort des Traumas kommt es häufig zu einer Einwanderung von PMN, die durch ihr unspezifisches überschießendes zytotoxisches Potential zur Schädigung von gesundem Gewebe und einer systemischen Entzündungsreaktion (*systemic inflammatory response syndrom*, SIRS) bzw. Sepsis führen können. Die häufigste Todesursache in Folge eines schweren Traumas ist die Entwicklung eines Sepsis-bedingten Multiorganversagens.

Die Vorversuche der Arbeit haben belegt, dass die nach einem Trauma verzögerte spontane PMN Apoptose mit einer intrinsischen Apoptoseresistenz einhergeht, die sich in Form einer Resistenz gegenüber dem Kinaseninhibitor Staurosporin (STS) äußert. Im Fokus dieser Arbeit stand die Identifizierung von Serumfaktoren, die eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln.

In dieser Arbeit konnte mittels chromatographischer Analyseverfahren  $\alpha$ -1-Antitrypsin (AAT), ein Akute-Phase-Protein, als Mediator der intrinsischen Apoptoseresistenz nach Trauma identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass serumeigenes AAT *in vitro* konzentrationsabhängig eine STS-Resistenz in PMN gesunder Probanden induzieren kann. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus wurde an dieser Stelle nicht genau untersucht, ist aber Bestandteil zukünftiger Untersuchungen. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt des Serums polytraumatisierter Patienten durch einen hitzestabilen, Albumin-unabhängigen Faktor vermittelt wird, der eine Größe von >50 kDa aufweist. Im Weiteren konnte AAT als ein wesentlicher Faktor für die intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma identifiziert werden.

## Abkürzungen

AAT	Alpha 1-antitrypsin
ALM	Akute myeloische Leukämie
ARDS	Akutes Lungenschädigungs-Syndrom
BSA	Rinderserumalbumin
CARS	Kompensatorisches antiinflammatorisches Syndrom
dest.	Destiliert
FACS	Durchflusszytometrie
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne
Fas	Fas-Rezeptor
sFas	löslicher Fas-Rezeptor
FCS	fötales Kälberserum
GM- CSF	Granulozyten- Makrophagen- Kolonie- stimulierender Faktor
IL	Interleukin
Ig	Immunoglobulin
ISS	<i>Injury Severity Score</i>
kDa	Kilodalton
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MPO	Myeloperoxidase
MOV	Multiorganversagen
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMN	neutrophile Granulozyten
PMNE	PMN Elastase
P/S	Penicillin / Streptomycin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS- Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom
STS	Staurosporin
TBS	Tris- gepufferte Salzlösung
TBS- T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TMED	Tetramethylethylenediamin
u.a.	unter anderem

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>II</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 TRAUMA.....	1
1.2 SIRS UND SEPSIS .....	2
1.3 CARS .....	3
1.4 DIE ROLLE VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN (PMN) IM IMMUNSYSTEM .....	5
1.5 REGULATION DER APOPTOSE IN PMN .....	5
1.6 INTRINSISCHER APOPTOSEWEG.....	6
1.7 EXTRINSISCHER APOPTOSEWEG .....	8
1.8 VERZÖGERTE APOPTOSERATE IN PMN NACH TRAUMA .....	8
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>1</b>
<b>3 MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIAL .....	12
3.1.1 GERÄTE .....	12
3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	13
3.1.3 SUBSTANZEN .....	15
3.1.4. MEDIEN .....	16
3.1.5 PUFFER UND LÖSUNGEN .....	17
3.1.6 SPENDER.....	21
3.2 METHODEN.....	22
3.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	22
3.2.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	26
3.2.3 STATISTISCHE ANALYSEN.....	35
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
4.1 DAS SERUM POLYTRAUMATISierter PATIENTEN HEMMT DIE SPONTANE PMN- APOPTOSE UND INDUZIERT EINE INTRINSISCHE APOPTOSERESISTENZ .....	36
4.2 GM-CSF AUS DEM SERUM POLYTRAUMATISierter PATIENTEN IST EIN KOFAKTOR IN DER INDUKTION DER INTRINSISCHEN APOPTOSERESISTENZ IN PMN .....	40
4.3 KLEINMOLEKULARE SERUMPROTEINE SCHÜTZEN NICHT VOR STS-INDUZierter APOPTOSE.....	42
4.4 DIE SERUMFAKTOREN DIE EINE STS-RESISTENZ IN PMN NACH TRAUMA VERMITTELN SIND HITZESTABIL .....	44
4.5 DAS MOLEKULARGEWICHT DER SERUMFAKTOREN DIE EINE STS-RESISTENZ IN PMN NACH TRAUMA VERMITTELT LIEGT ÜBER 50 kDA .....	45

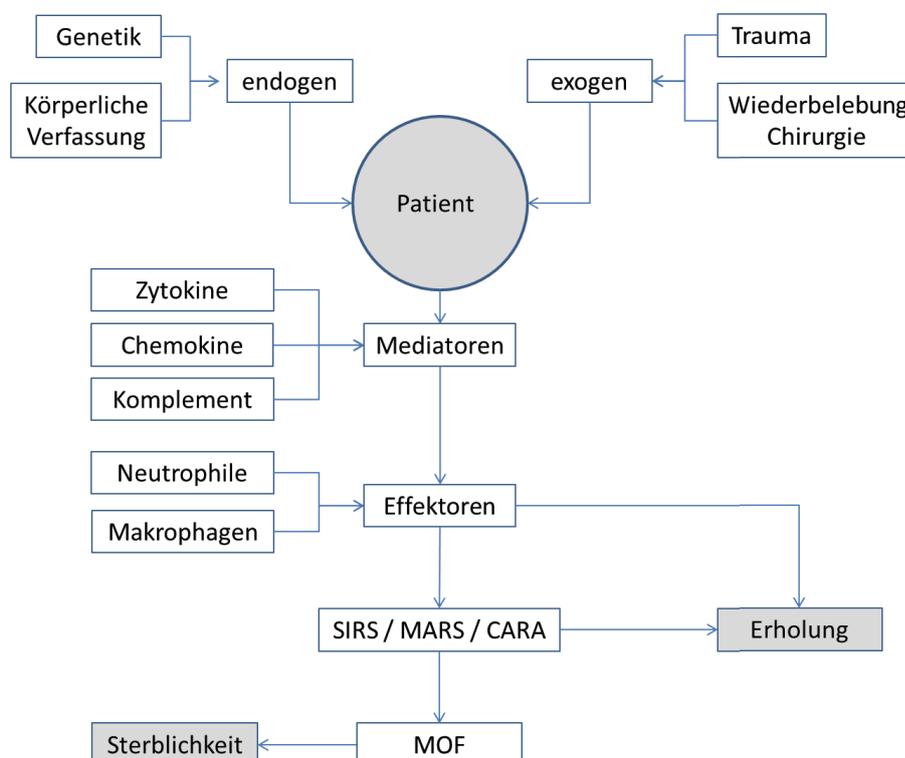
<b>4.6 DAS ZUSAMMENSPIEL MEHRERER FAKTOREN IM SERUM POLYTRAUMATISierter PATIENTEN INDUZIERT EINE INTRINSISCHE APOPTOSERESISTENZ IN PMN.....</b>	<b>46</b>
<b>4.7 DER ANTIAPOPTOTISCHE EFFEKT DES SERUMS POLYTRAUMATISierter PATIENTEN WIRD DURCH HITZESTABILE ALBUMIN-UNABHÄNGIGE SERUMFAKTOREN VERMITTELT</b>	<b>50</b>
<b>4.8 MASSENSPEKTROMETRISCHE DETEKTION DER PEPTIDE BETEILIGT AN DER SERUM-INDUZIERTEN INTRINSISCHEN APOPTOSERESISTENZ IN PMN NACH POLYTRAUMA.....</b>	<b>53</b>
<b>4.9 DIE GESUCHTEN SERUMFAKTOREN AGIEREN IMMUNGLOBULIN-ABHÄNGIG .....</b>	<b>57</b>
<b>4.10 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER FAKTOREN IM ELUAT 8xTRIS HCL ZUR DETEKTION VON ANTIAPOPTOTISCH WIRKENDEN SERUMFAKTOREN ..</b>	<b>61</b>
<b>4.11 EFFEKT VON AAT AUF DIE STS-RESISTENZ IN PMN.....</b>	<b>66</b>
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>68</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>85</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Trauma

Unter einem Polytrauma versteht man einen durch äußere Einwirkung akut entstandenen körperlichen Schaden, mindestens 2 verschiedener Organsysteme, wovon einer als lebensbedrohlich gilt (Tscherne et al. 1987).

In der westlichen Welt ist Trauma einer der Haupttodesursachen von Menschen unter 50 Jahren (Probst et al. 2009). Patienten sterben an den Folgen ihrer Verletzungen oder zusätzlichen Gewebe- oder Organschädigungen im Rahmen dysregulierter Immunreaktionen. Dabei wird die Mortalität und Morbidität nach schweren Verletzungen von der Traumareaktion (*host defense syndrom*) bestimmt, auch bekannt als systemisch inflammatorische Reaktion (*systemic inflammatory response syndrom*, SIRS) (An et al. 2012).



**Abbildung 1 Schema zur Ätiologie und Pathologie von posttraumatischen Organversagens**

Das Schema von Hietbrink et al. 2006 zeigt das Zusammenspiel entscheidender Elemente um die Immunreaktion und schlussendlich Outcome des Patienten nach Trauma. Modifiziert nach Hietbrink et al. 2006 (Hietbrink et al. 2006).

Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen im Immunsystem. Nach einem Trauma kommt es zur Aktivierung beider Systeme, über Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Komplement) und Effektorzellen (PMN, Makrophagen). Somit besteht die posttraumatische Immunreaktion aus simultan ablaufenden, divergenten Antworten: Zur Aufrechterhaltung einer Homöostase werden neben der proinflammatorischen Reaktion (SIRS) auch antiinflammatorische Mediatoren produziert (*compensatory anti-inflammatory response syndrom CARS*) (Keel und Trentz 2005).

Je nach Prädisposition des Patienten (endogene und exogene Faktoren) kann es zu einem Ungleichgewicht in der Immunreaktion hin bis zum SIRS kommen und die physiologische posttraumatische Reaktion überschießend-dysfunktional mit einer Gewebeschädigung einhergehen (Abb. 1). Die dann resultierenden Organschäden und etwaiges Organversagen sind mitunter entscheidend für die Mortalität bzw. Erholungsdauer des Patienten. Über 5% der Patienten, die nach schwerem Trauma eingeliefert werden, entwickeln ein multiples Organversagen (MOV) (Cobb und O'Keefe 2004).

## 1.2 SIRS und Sepsis

Per Definition ist eine Sepsis eine SIRS mit infektiologischer Ätiologie. Die Diagnose SIRS beinhaltet somit nicht zwangsläufig das Vorliegen einer infektiösen Genese, weitere Ursachen können u.a. Trauma, Operation, Verbrennungen oder Pankreatitis (abakterielles Entzündungsgeschehen) sein (Levy et al. 2003). Die Mortalität eines Patienten mit SIRS-induziertem Multiorganversagen ist um 50-80% erhöht (Mannick et al. 2001). Die SIRS ist mit steigender Inzidenz ein häufiger Todesgrund auf Intensivstationen in den USA und Deutschland und somit klinisch bedeutsam (Brunkhorst 2006). Anhand von objektivierbaren, klinischen Parametern wird SIRS definiert, wobei mindestens 2 von 4 Kriterien für eine Diagnose vorliegen müssen. Anhand der Kriterien wird deutlich, dass SIRS alles in allem eine generalisierte Entzündungsreaktion darstellt (Bone et al. 1992).

Kriterien einer SIRS:

1. Herzfrequenz > 90 Schläge/ min
2. Atemfrequenz > 20/ min bzw. Hyperventilation mit Abfall des arteriellen CO<sub>2</sub>- Partialdruckes unter 32 mmHg.
3. Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
4. Leukozytenzahl > 12 000/ µl oder < 4000/ µl oder >10% PMN

Quelle: <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/faq/icd-10/icd-10-gm/maticd-sirs-def-2007-1007.pdf> (siehe Anhang)

Als Voraussetzung für eine Entstehung von SIRS gilt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, den Effektorzellen (Makrophagen, Granulozyten), sowie Mediatoren und eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiinflammatorischen Vorgängen hin zur entzündungsfördernden Seite (Keel und Trentz 2005).

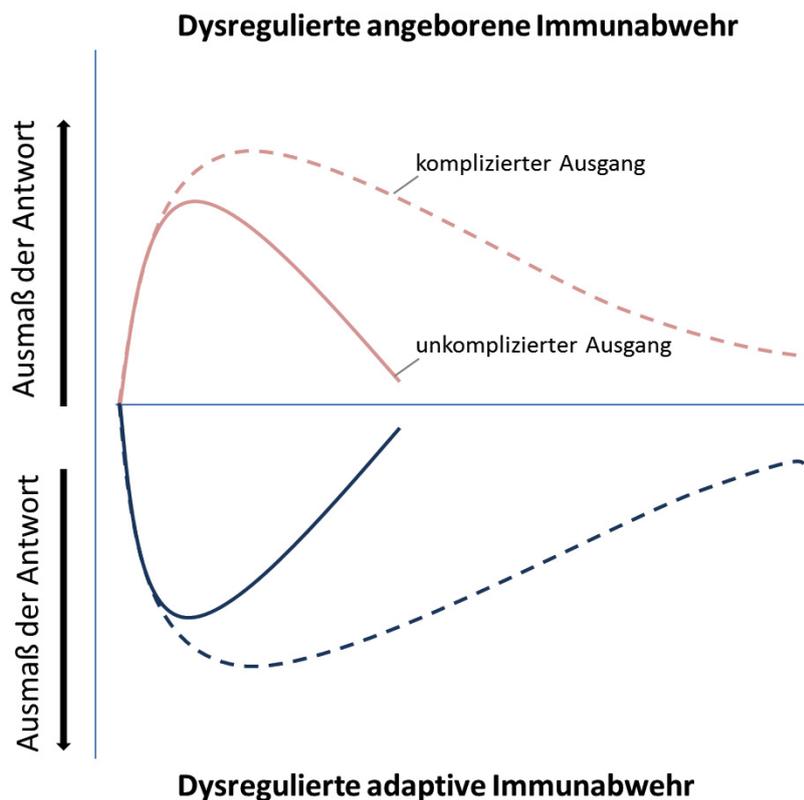
Zytokine sind eine wichtige Komponente des Immunsystems, als Botenstoffe in der Zell-Zell Interaktion sind sie an vielen pathologischen Aspekten der SIRS und Multiorgan dysfunktions-Syndroms (MODS) Kaskade beteiligt. In der Tat ist eine schwere Sepsis u.a. als eine überschießende Zytokin-Produktion (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF und G-CSF) charakterisiert (Mannick et al. 2001).

Somit ist die SIRS eine hyperinflammatorische, dysfunktionale Immunreaktion, Abwehrzellen richten sich u.a. gegen körpereigenes Gewebe und die Inflammation breitet sich auf den gesamten Organismus aus. Auf Grund von ausgeprägten Gewebeschäden oder Entzündungen kann im Verlauf der SIRS ein Multiorgan dysfunktionssyndrom entstehen. In diesem Fall spricht man auch von einem Multiorganversagen (Matsuda N 2006).

## 1.3 CARS

Nach Trauma wird simultan zu der proinflammatorischen Reaktion (SIRS), mit dem Ziel das Gleichgewicht im Organismus wiederherzustellen, eine kompensatorische antiinflammatorische Antwort eingeleitet (Abb. 2) (Novotny et al. 2012). Dieses als CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrom*) bezeichnete Phänomen charakterisiert sich auch durch eine verminderte HLA-DR Expression auf Monozyten, reduzierte TNF- $\alpha$  Produktion, erhöhte T-Zell Apoptose, T-Zellanergie

und eine Mitogen-Unempfindlichkeit und stellt damit eine Reaktion des erworbenen Immunsystems dar (Keel und Trentz 2005). Die Rolle der im Rahmen von CARS produzierten Zytokine, wie IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-11 und IL-13, ist die Inhibition der Produktion von proinflammatorischen Faktoren und Verschiebung des Gleichgewichts zur antiinflammatorischen Seite (Mannick et al. 2001).



**Abbildung 2 Darstellung der posttraumatischen Reaktion des Immunsystems**

Das Modell demonstriert die rapide Aktivierung der angeborenen proinflammatorischen Immunantwort (SIRS) und die gleichzeitige Unterdrückung des erworbenen Immunsystems (CARS) als einen fließenden, simultan-divergent statt findendem Prozess nach Trauma. Des Weiteren sind komplizierte Krankheitsverläufe zeitlich verlängert und resultieren in einem dysregulierten, „paralysierten Zustand“ des Immunsystems. Das „Outcome“ des Patienten wird allgemein von der Stärke der Immunreaktion bestimmt. Modifiziert nach Xiao et al. 2011 (Xiao et al. 2011).

Während auf der einen Seite der antiinflammatorische Prozess und die reduzierte Effektor-T-Zell Funktion zur Limitierung und Lokalisierung der posttraumatischen Reaktion notwendig ist, kommt es auf der anderen Seite, bei Überwiegen der antiinflammatorischen Reaktion, simultan zu einer Immunsuppression, einer Unfähigkeit adäquate Reaktionen auf neue Bedrohungen zu produzieren. Im

posttraumatischen Verlauf geht die Immunsuppression mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einher, sodass ernste Komplikationen wie Sepsis und septischer Schock mit darauffolgendem Organversagen das System bedrohen (Keel und Trentz 2005).

## 1.4 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten (PMN) im Immunsystem

PMN stellen eine Schlüsselkomponente im angeborenen Immunsystem dar, die „Sofort-Effektoren“ prägen als unspezifische Verteidigungslinie die erste inflammatorische Immunreaktion nach einem Trauma (Hernandez et al. 1987a).

$10^{11}$  PMN werden täglich im Knochenmark unter kontrollierten Bedingungen produziert, im Rahmen einer Inflammation kann die Zahl um ein Vielfaches steigen. Damit stellt der Zelltyp die größte Population bei den Leukozyten und der Subgruppe der Granulozyten dar (Christopher und Link 2007).

Durch Zytokine am Ort der Entzündung mobilisiert, bekämpfen PMN pathogene Mikroorganismen mittels Phagozytose, oxidativen *Burst*, Degranulation und über die Freisetzung von extrazellulären Chromatin-Protein Fallen (NET, *neutrophil extracellular trap* (Brinkmann et al. 2004)). PMN setzen ihr zytotoxisches Potential sehr unspezifisch ein, die übermäßige Freisetzung proteolytischer Enzyme, wie Elastase oder Myeloperoxidase (MPO) oder ROS trägt auch zur Schädigung von gesundem Gewebe bei (Duffin et al. 2010). Die Zellen weisen einen Janus-Charakter auf, ein Gleichgewicht zwischen dem Überleben und dem physiologischen Zelltod der PMN ist grundlegend für die Kontrolle der Funktionalität der potentiell toxischen Zellen (Smith 1994).

Somit kann die Verzögerung des Apoptoseprozesses in Folge eines Traumas sowohl die Entwicklung einer SIRS, als auch Gewebeschädigungen und MOV begünstigen.

## 1.5 Regulation der Apoptose in PMN

Die Regulation der Lebensspanne von PMN ist essentiell für die Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen der funktionellen Nützlichkeit der Zellen als Effektoren des Immunsystems und ihrer potentiellen Schädlichkeit für das Wirtsgewebe. Die

Apoptose ist somit für die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Entwicklung der Immuntoleranz und für das Abklingen der Inflammation entscheidend (Akgul et al. 2001)

Die spontane Apoptose veralteter PMN setzt in Abwesenheit von Zytokinen von selbst ein und endet in der Phagozytose durch Makrophagen (Savill 1997). Ähnlich wie bei vielen anderen Zelltypen wird der physiologische Zelltod der Granulozyten durch 2 Signalwege kontrolliert; dem intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg (Igney und Krammer 2002). Während der spontanen Apoptose in PMN werden beide Signalwege, der Mitochondrien-abhängige und Rezeptor-vermittelte Weg aktiviert (Daigle und Simon 2001).

Klinisch ist vor allem die Korrelation zwischen SIRS bzw. MOV und Störungen im Apoptoseprozess von PMN bedeutsam (Partrick et al. 1996)

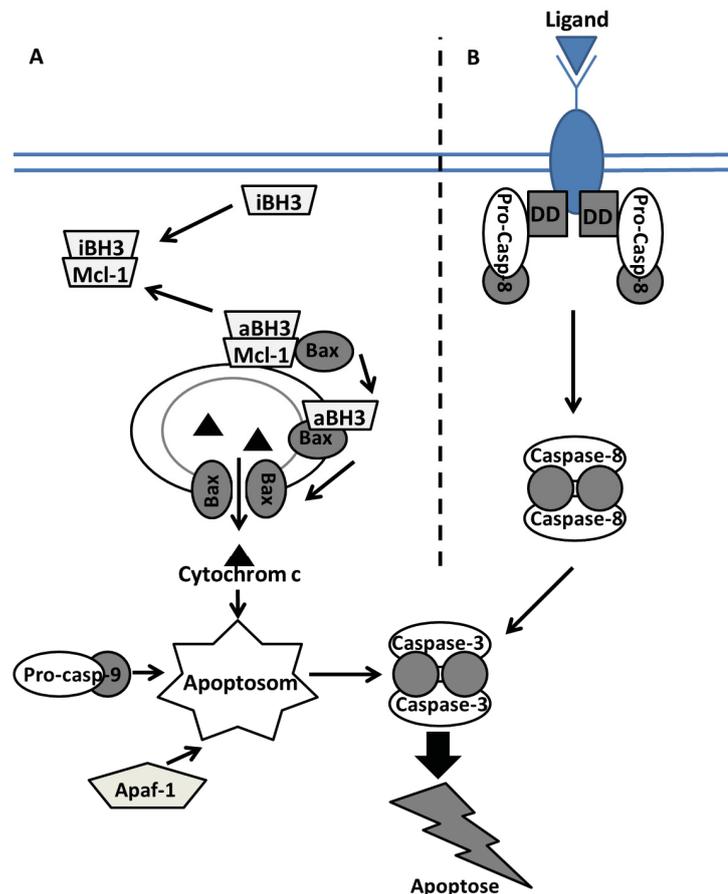
## 1.6 Intrinsischer Apoptoseweg

Der intrinsische Apoptosesignalweg kann durch intrazelluläre Stress-Signale und einer Vielzahl an exogenen Stimuli induziert werden.

Der Signalweg besteht aus einem Zusammenspiel von Mitochondrien, Bcl-2 Proteinen, Caspasen und ist als primärer Apoptoseweg in PMN von großer Bedeutung. Bei der Regulation der Apoptose nehmen Mitglieder der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle ein und vertreten pro- und antiapoptotische Mediatoren. Das Verhältnis zwischen den gegensätzlich wirkenden Mediatoren in der Zelle entscheidet über ihren Fortbestand (Gross et al. 1999). PMN exprimieren mehrere proapoptotische Bcl-2 Vertreter, einschließlich Bax, Bad, Bak, Bid, Bik (Akgul et al. 2001). Die wichtigsten antiapoptotischen Proteine, die in PMN nachgewiesen wurden, sind Mcl-1 und A-1 (Santos-Beneit und Mollinedo 2000). Die Expression von beiden antiapoptotischen Bcl2-Proteinen kann unter anderem durch Zytokine, wie GM-CSF und TNF- $\alpha$ , verstärkt werden (Cross et al. 2008).

Das Mitochondrium ist Zentrum des intrinsischen Signalwegs. In Abwesenheit von Triggern wird die Integrität der Mitochondrienmembran durch eine Balance zwischen den anti- und proapoptotischen Proteinen aufrechterhalten. Die Doppelmembranen und tubulären Strukturen der Mitochondrien besitzen ein transmembranöses Potential. Im Verlauf der Apoptose verändert sich die Form der

Organelle hin zu perinukleären Bündeln und proapoptotische Proteine, wie Bax und Bid, fusionieren an die äußere, depolarisierte Membran und führen zu einer Permeabilitätssteigerung dieser Bündel (Elmore 2007). Das Ergebnis ist die Freisetzung von proapoptotischen mitochondrialen Proteinen, wie Cytochrom-C oder Smac/Diablo und schließlich die Apoptose (Du et al. 2000).



**Abbildung 3 Die Apoptosesignalwege in PMN**

A Der intrinsische Signalweg wird von den Proteinen der Bcl-2- Familie reguliert.

B Der extrinsische Signalweg wird über eine Liganden- Rezeptor-Bindung ausgelöst. (Modifiziert nach Helen L. Wright et al. 2010 Wright et al. 2010)

Staurosporin (STS) ist ein natürlich vorkommendes Zellgift, welches den intrinsischen Signalweg der Zellapoptose in PMN aktiviert (Bruno et al. 1992). STS wurde in der vorliegenden Arbeit für die modellhafte Einleitung der intrinsischen Apoptose in PMN verwendet.

## 1.7 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische, Rezeptor-abhängige Apoptoseweg hat mit dem Mitochondrien-abhängigen, intrinsischen Apoptoseweg eine gemeinsame Endstrecke: die Caspasen-Kaskade (Abb.3) (Elmore 2007).

Dieser Signalweg wird durch eine Liganden-Rezeptor-Interaktion initiiert. Die Todesrezeptoren sind Zelloberflächenmoleküle, welche ein intrazelluläres Signal bei Bindung ihrer Liganden ausbilden. Kommt es zu einer Rezeptoraktivierung, wobei der entsprechende Fas-Ligand an seinem Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet, trimerisiert die intrazelluläre Domäne des Rezeptors mit anschließender Anlagerung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated Death Domain Protein*) und Pro-Caspase-8 zum DISC-Komplex (*death-inducing signaling complex*). Im nächsten Schritt kommt es zu der endständigen, gemeinsamen Caspasen-Kaskade: Nach Dimerisierung und autoproteolytischer Spaltung wird die Caspase-8 frei und aktiviert durch Proteolyse die Effektorcaspasen (Simon 2003).

## 1.8 Verzögerte Apoptoserate in PMN nach Trauma

Die physiologische Lebensdauer von ausdifferenzierten PMN im Blutkreislauf beträgt 8-20 h (Maiani et al. 2004). Christopher et al. beschreiben 2007, dass nach einem schweren Trauma zusätzlich ein Vielfaches mehr an PMN aus dem Knochenmark freigesetzt wird, als im Normalzustand. Posttraumatisch ist die Lebensdauer von PMN signifikant verlängert, unter anderem verursacht durch die aktivierende Wirkung von bakteriellen Antigenen, wie Endotoxin und pro-inflammatorischen Zytokinen (GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-6, IL-2), die nach einer schweren Verletzung sezerniert werden (Paunel-Gorgulu et al. 2009). Die verlängerte Lebensspanne nach Trauma kann im Rahmen einer SIRS bis zu 3 Wochen anhalten (Wagner et al. 2000) und geht mit einer Verstärkung der einzelnen Funktionen der PMN (Proteasen, Elastasen, ROS) einher. Die vermehrte Sekretion proteolytischer Enzyme kann wiederum zur Schädigung von gesundem Gewebe im Organismus beitragen (Bhatia et al. 2006). Die posttraumatische Hyperinflammation des Immunsystems und inhibierte Apoptose der PMN kann zu einer anhaltenden SIRS führen, assoziiert mit Gewebsschäden und einem konsekutivem MOV. In diesem

Zusammenhang wurde in einer prospektiven Studie gezeigt, dass PMN von Patienten mit Sepsis-induzierter ARDS und der höchsten Mortalitätsrate die niedrigste PMN-Apoptoserate aufwiesen, verglichen mit der PMN Apoptoserate von Patienten mit unkomplizierter Sepsis (Fialkow et al. 2006). Es besteht eine Korrelation zwischen erhöhter PMN-Aktivität und dem Vorkommen von SIRS und MOV (Partrick et al. 1996). Dabei ist weitgehend anerkannt, dass die Beendigung einer Entzündungsreaktion oder SIRS vor allem von der Einleitung des programmierten Zelltodes der PMN abhängig ist (Botha et al. 1995).

Frühere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe, sowie andere Arbeiten haben gezeigt, dass die Trauma-bedingte verlängerte Lebensdauer auf Serumfaktoren zurückzuführen ist (Kawakami et al. 2004). Die Inkubation von PMN gesunder Probanden mit Serum polytraumatisierter Patienten induziert eine Hemmung der intrinsischen Apoptose (Paunel-Gorgulu et al. 2009). In der Literatur sind eine Vielzahl an antiapoptotisch-wirkenden Faktoren beschrieben die gleichzeitig PMN aktivieren können (Tabelle 1). Nach einem Trauma kommt es zu einem deutlichen Proteinkonzentrationsanstieg von dem antiapoptotisch wirkenden Mcl-1 in PMN (Paunel-Gorgulu et al. 2012), gefördert durch den Überlebensfaktor GM-CSF, welcher einen positiven Effekt auf die Expression von Mcl-1 hat und gleichzeitig zu einer Beeinträchtigung Fas-mediiertes Effekte führt, die essentiell für den extrinsischen Apoptoseweg sind. In der Studie von Kotone-Miyahara ist 2004 aufgezeigt worden, dass rekombinantes GM-CSF die Rekrutierung von FADD an den Fas-Rezeptor verzögert. Jedoch wird auch gezeigt, dass die verminderte Fas-Sensitivität nach verstärkter Fas-Rezeptor Stimulation aufgehoben wird (Kotone-Miyahara et al. 2004). Das Fas- System ist in inflammatorischen PMN nicht gehemmt, wirksam und somit nicht an den pathologischen Prozessen nach Trauma beteiligt (Logters et al. 2010).

Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe machten erstmalig deutlich, dass die Trauma-bedingt verlängerte Lebensdauer von PMN auf einer Inhibition des Mitochondrien-abhängigen intrinsischen Apoptose-Signalwegs beruht (Paunel-Gorgulu et al. 2009).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung unbekannter Serumfaktoren, die nach einem Trauma zu der verlängerten Lebensspanne von PMN beitragen.

**Tabelle 1 PMN-aktivierende Faktoren**

<b>Faktor</b>	<b>Priming</b>	<b>Verzögerung der Apoptose</b>	<b>Referenz</b>
G-CSF	Ja	Ja	(Colotta et al. 1992)
GM-CSF	Ja	Ja	(Moulding et al. 1998)
INF- $\gamma$	Ja	Ja	(Klebanoff et al. 1992)
IL-1 $\beta$	Ja	Ja	(Moulding et al. 1998); (Colotta et al. 1992)
IL-8	Ja		(Fujishima et al. 1993)
IL-15		Ja	(Girard et al. 1996)
TNF- $\alpha$	Ja	Ja	(Cross et al. 2008)
Mcl-1 / A-1		Ja	(Derouet et al. 2004),(Edwards et al. 2004)
LPS		Ja	(Moulding et al. 1998)

(Helen L. Wright et al. 2010; Wright et al. 2010)

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Als Folge eines schweren Traumas kommt es häufig zu einer Hyperaktivierung neutrophiler Granulozyten (PMN), gefolgt von einer systemischen Abwehrreaktion (SIRS) und multiplem Organversagen (MOV). Obwohl bislang bekannt war, dass PMN nach Trauma eine verlängerte Lebensdauer aufgrund eines gestörten programmierten Zelltods aufweisen, sind die regulatorischen Mechanismen bislang weitgehend ungeklärt geblieben. Gegenstand der vorliegenden Dissertationsschrift war die Aufklärung der molekularen Serumfaktoren zwischen posttraumatischer Inflammation und Apoptoseresistenz in PMN nach schwerem Trauma.

Die Trauma-bedingte verlängerte Lebensdauer von PMN beruht auf einer Inhibition des Mitochondrien-abhängigen intrinsischen Apoptose-Signalweges. Die Behandlung von PMN gesunder Probanden mit dem Serum polytraumatisierter Patienten ist ausreichend um eine signifikante Hemmung der PMN-Apoptose zu erzielen. Die Konzentration des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 ist in PMN nach Trauma deutlich erhöht und unterliegt einem positiven Regulationsmechanismus des „Überlebensfaktors“ GM-CSF. In vorherigen Arbeiten konnte GM-CSF als Mediator für eine gesteigerte Erregbarkeit und Funktionalität von PMN unter Inflammation identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit hat es sich zum Ziel gemacht Serumfaktoren zu identifizieren, denen die intrinsische PMN-Apoptoseresistenz nach Trauma zugrunde liegt.

### 3 Material & Methoden

Roth – Karlsruhe, Deutschland

Sigma – Deisenhofen, Deutschland

Serva – Heidelberg, Deutschland

Merck – Darmstadt, Deutschland

BioRad – München, Deutschland

Thermo – Dreieich, Deutschland

Qiagen– Hilden, Deutschland

Promega – München, Deutschland

Biochrom – Berlin, Deutschland

Eppendorf – Hamburg, Deutschland

Life Technologies GmbH (Invitrogen) – Darmstadt, Deutschland

VWR – Darmstadt, Deutschland

Waldner – Wangen, Deutschland

GE – Freiburg, Deutschland

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Abzug	Waldner
Semi-Dry Blotter	Life Technologies™ Blotter: Novex®
HERAcell® 150	Thermo Electron Corporation
FACSCalibur	BD Biosciences
Haraeus Pico 17 Microcentrifuge	Thermo Scientific
Haraeus Megafuge 16 R	Thermo Scientific
Gel Doc System	BioRad
Drybath	Fisher scientific

IKAMAG® safety control	IKA® RET control/t
Axiovert 40 Mikroskop	Zeiss
Multipette® plus	Eppendorf
Basics pH/ORP Benchtop Meter	HANNA instruments HI 2211
Accu-jet® pro	BRANDS
Fix 10-100 µl	Eppendorf Research®
Fix® 100-1000 µl	Eppendorf Research
Fix® 0,5 – 10 µl	Eppendorf Research
DH09306	Thermo Scientific
Taumel- Rollenmischer	RMS- V 1750
V Multilabel Counter model 1420	Perkin Elmer VICTOR3™
Electronic Balance Typ ABJ2204	KenABJ Log NoA01
HERAsafe®	Thermo Electron Corporation
Haraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Electron Corporation
Novex Semi-Dry Blotter	Invitrogen
HPLC Chromatograph	Äktipurifier, INV- 907; GE

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

2,0 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
0,5 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
15 ml bio- oneCellstar Tubes	GREINER
50 ml bio- oneCellstarTubes	GREINER
48-Well Culture Plate	GREINER
96-Well CELLSTAR®	GREINER
Pasteurpipetten ISA 7712	Brand GmbH + Co Kg
Pasteurpipetten Plastik	Ratiolab, Dreieich
Costar® 10 ml Stripette®	Serological Pipets
Costar® 25 ml Stripette®	Serological Pipets
Costar® 2 ml Stripette®	Serological Pipets
Costar® 5 ml Stripette®	Serological Pipets

Cell Culture Flasks 75 cm <sup>2</sup> red filter cap	CELLSTAR®
Zählkammer	Neubauer
Vacutainer Safety Lok Blood Collection Set REF367286	BD
Kodan	Schülke
Vacutainer Plus Blood Collection Tubes REF368889	BD
Dialysis Membranes Cellulose Ester Spectra/ PorBiotec	Spectrum Labs MWCO 50000; Flath Wide: 10 mm; Diameter: 6,4 mm
Float-A-Lyzer G2 dialysis device (molecular weight cut off 50 kDa)	Spectrum Labs
Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassettes	Thermo Scientific
Slide-A-Lyzer® 20K Dialysis Cassettes	Thermo Scientific
Slide-A-Lyzer® 2K Dialysis Cassettes	Thermo Scientific,
Filter Unit 0,45 µm MF-Millipore MCE Membrane	MILLEX® HA
PeqlabPorsize: 0,2 mm	MILLEX®
Glasplatten 10 mm	BioRad
Casting Stands	BioRad
Casting Frames	BioRad
Filterpapier 2,5 mm	Invitrogen
HiTRAP Blue, RiueHp 5 ml	GE
Superose 6 10/300 GL	GE

## 3.1.3 Substanzen

Ammoniumsulfat	99%, Enzymqualität, Roth
Triton-X-100	Sigma
Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000 ml
Demi H <sub>2</sub> O	Fischer
Staurosporin	Cayman Chemical
Alcianblau-Lösung für die Mikroskopie	Merck KGaA 101647
BSA Fraction V pH 7,0	PAA
Essigsäure 96% zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA 100062
Glycin zur Analyse	Merck KGaA 104201
Methanol zur Analyse EMSURE® ACS,ISO,Reag. PhEur	Merck KGaA 106009
NaCl 0,9%-Spüllösung	B. Braun
Natriumchlorid zur Analyse	VWR®
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck 6398
PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) PBS-Lösung mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG
Ponceau S	SERVA Electrophoresis
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin zur Analyse	VWR®
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth®
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Molecular Biology Grade Calbiochem®
Protein G Plus/ Protein A, Agarose Suspension	Calbiochem

Propidiumiodid	Sigma
Retinolsäure/ ATRA	Sigma
Easycoll Solution density 1.124 g/ml,	Biochrom AG
RPMI 1640 w/ stable Glutamine	Biochrom AG
Fetal Bovine Serum Gold	PAA
Penicillin-Streptomycin 100X Solution (Dulbecco)	Gibco®
Ethanol denaturated with about 1% methyl ethyl ketone for analysis EMSURE®	Merck KGaA 100974
Ethanol	Merck UN 1170
Tris-Hydrochloride	Merck KGaA 648310648313 ULTROL® Grade Calbiochem®
2- Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH M7154 for electrophoresis
APS	SIGMA
30 % Acrylamid	Bio-Rad /Bis Solutions, Roth
Glycerol	Carl Roth®
0,01 % Bromphenolblau	Carl Roth®
Natriumdodecylsulfat	VWR® SDS für die Molekularbiologie
Peroxidase-Goat Anti-Human IgG, IgA, IgM (H+L)	Invitrogen
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Alpha 1-Antitrypsin	Sigma
Formaldehyd	Sigma F-8775
AgNO <sub>3</sub>	Sigma S-0139
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sigma S-1648
ATRA	Sigma

### 3.1.4. Medien

## **Wachstumsmedium für HI-60 Zellen:**

500 ml RPMI 1640 mit stabilem Glutamin

50 ml FCS

5 ml Penicillin/Streptomycin

## **Versuchsmedium:**

500 ml RPMI 1640 mit stabilem Glutamin

5 ml Penicillin/Streptomycin

## **3.1.5 Puffer und Lösungen**

### **Western Blot**

#### **Sammelgel: (für 1 Gel)**

650 µl 30% Acrylamid

3 ml H<sub>2</sub>O

1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer

10 µl TEMED

25 µl 10% APS

#### **10%iges Trenngel: (für 1 Gel)**

3,125 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml 30% Acrylamid

1,875 ml 4 x Trenngelpuffer

10 µl TEMED

25 µl 10% APS

#### **Laufpuffer:**

25 mM Tris (pH 8,3-8,8)

192 mM Glycin

0,1% SDS

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### **Tris-Glycine Transferpuffer**

12 mM Tris-Base

96 mM Glycin

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### **Blotting- Puffer (2x Tris-Glycine Transferpuffer)**

0,08 ml 25x Transferpuffer

75 ml Methanol

ad 750 ml H<sub>2</sub>O

### **4x Trenngelpuffer**

91 g Tris (1,5Mm; pH 8,8)

2 g SDS (0,4%)

ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### **4x Sammelgelpuffer**

0,5 mM Tris (pH 6,8)

0,4% SDS

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

### **TBS**

Für 1 x Puffer

7,7 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

### **4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer (4x Lämmli-Puffer)**

252 mM 1 M Tris-HCL (pH 6, 8)

40% Glycerol

8% SDS

eine Spatelspitze 0,01% Bromphenolblau

ad 10 ml H<sub>2</sub>O

vor Gebrauch: 20% Mercaptoethanol zusetzen

## **TBS-T**

100 ml 10x TBS

1 ml Tween (0,1% Endkonzentration)

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

## **Blockierlösung: 5% BSA**

5% BSA in TBS-T

## **Coomassie-Brillant-Blue (1 l)**

250 ml Coomassie

50 ml TCA

250 ml Methanol

## **Entfärber-Lösung (1 l)**

133 ml Methanol

200 ml Eisessig

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

## **Silbernitratfärbung:**

### **Fixierlösung (100 ml)**

50 ml H<sub>2</sub>O

40 ml Ethanol

10 ml Essigsäure

### **Waschlösung (100 ml)**

70 ml H<sub>2</sub>O

30 ml Ethanol

### **Sensitizer-Lösung (100 ml)**

0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O

## **Silberlösung**

100 mM AgNO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O

0,02% Formaldehyd

### **Entwicklerlösung (100 ml)**

2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O (w/w)

0,04 g Formaldehyd

### **Essigsäure 5% (100 ml)**

5 ml 100% Essigsäure in 95 ml H<sub>2</sub>O

### **Essigsäure (100 ml)**

1 ml 5% Essigsäure in 95 ml H<sub>2</sub>O

### **Glycinpuffer: pH 2,7**

100 mM Glycin

ad 500 H<sub>2</sub>O

### **1% Natrium-Citrat-Lösung**

1 g Natrium-Citrat

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

### **0,1% Natrium-Citrat-Triton-X-Lösung/ hypotone Zellyse (100 ml)**

10 ml Natriumcitrat

0,1 ml Triton-X 100

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

### **Propidiumiodidlösung zur Apoptoseratebestimmung per FACS**

0,5 ml Propidiumiodid (1 mg/ml)

9,5 ml 0,1% Natriumcitrat + 0,1% Triton- X- Lösung

ad 10 ml

## **Erythrozytenlyse-Lösung (1L)**

83 g Ammoniumchlorid

1 g KHCO<sub>3</sub>

0,4 g EDTA

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

## **Bindungspuffer**

20 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 8,0

ad 1000 ml

## **Elutionspuffer**

20 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 8, 0

5 M NaCl

ad 1000 ml

### **3.1.6 Spender**

Das zu untersuchende Serum von Polytraumapatienten wurde von Patienten entnommen, die an der Klinik für Unfall- und Handchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf eingeliefert wurden, zwischen 18 - 80 Jahren alt waren und sich bereit erklärten an der Studie teilzunehmen. Dabei wurde Serum ab Tag eins bis zehn entnommen und eingefroren. Das verwendete Polytraumaserum in den Experimenten der folgenden Arbeit war gepooltes Serum von Tag eins bis zwei nach Trauma von mehreren Spendern. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf hat diese Studie genehmigt (Nr 3412).

Für die Experimente wurden PMN gesunder Probanden eingesetzt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Herstellung einer reinen Granulozyten – Population

Für den Zweck Serumeffekte polytraumatisierter Patienten an polymorphkernigen Leukozyten (PMN) auszutesten, wurden reine Granulozyten-Populationen von gesunden Spendern isoliert.

Für die Isolation von PMN wurden zunächst 5-40 ml Blut mittels Heparin-Röhrchen entnommen. Nach Anzahl der Heparin-Röhrchen (ca. 5 ml) wurden 15 ml Falcons mit je 5 ml Percoll (Biochrom AG; Dichte 1,124 g/ml) + 3,4 ml 0,9% NaCl (Physiologische Kochsalzlösung) vorbereitet, unter Berücksichtigung einer vollständigen Vermischung beider Flüssigkeiten. Im nächsten Schritt konnte das Probenvolumen aus den Heparin-Röhrchen aufgenommen und der Inhalt langsam in das dafür vorbereitete Falcon pipettiert werden, sodass das Blut sich auf dem NaCl/Percoll-Gemisch sammelte. Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt für 25 min bei RT bei 2000 rpm ohne Bremse.

Die gewählte Verdünnung des Percolls führte zu einer Ablagerung der polymorphkernigen Zellen im Rest-Erythrozyten-Sediment. Die mononukleären Zellen befanden sich im oberen Überstand. Weiterhin wurde der Überstand nach erfolgreicher Auftrennung des Dichtegradienten der Blutprobe abgenommen und das rote Pellet mit 5 ml ‚Erythrozytenlyse-Lösung‘ und Pasteurpipette aufgenommen und in ein 50 ml Falcon gegeben mit 45 ml Erythrozytenlyse-Lösung.

Nach vorsichtigem Schwenken des 50 ml Falcons lag dieses bei 4 °C für 7 min. Anschließend wurde es für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, so dass sich die PMN am Boden des Falcons absetzten. Es folgte ein Waschschrift der PMN mit 50 ml PBS und die nochmalige Zentrifugation für 5 min bei RT, 1500 rpm, um die aufgewirbelten PMN's am Boden zu sedimentieren.

Zum Schluss wurde der Überstand durch erneut rasches Kippen verworfen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und die nun isolierten Granulozyten konnten 1:4 mit Trypanblau verdünnt und anschließend in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden.

### 3.2.1.2 Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie (FACS – Analyse)

Die Durchflusszytometrie wurde als Messverfahren zur Erfassung der Apoptoserate von PMN bzw. von HL-60 Zellen verwendet. Die Zellen fließen per hydrodynamischer Fokussierung in hohem Tempo und gerichtetem laminarem Probenstrom an einem monochromatischen Licht (Laser) vorbei. Das Prinzip der Untersuchung besteht darin, dass wenn die mit Farbstoff-markierten Zellen den Lichtstrahl des FACS-Gerätes passieren, nach Absorption von Lichtenergie durch das Flourochrom, Emissionen in höherer Wellenlänge abgegeben und diese im optischen System des FACS-Gerätes von einem Detektor erfasst werden. Die Emissionen werden im Gerät über ein System aus Spiegeln, Linsen und Filtern zum Detektor geleitet und durch einen Photomultiplier verstärkt.

Die Quantifizierung der Apoptose wurde nach dem etablierten Prinzip von Nicoletti und seinen Mitarbeitern unter Anwendung von Propidiumiodid (PI) durchgeführt (Nicoletti, 1991, 13). Der fluoreszierende Farbstoff PI, welcher an Zell-DNA interkaliert (zwischen den Basen bindet), wurde in einer hypotonen Lösung (0,1% NaCl, 0,1% Triton-X 100) zu den zu analysieren Zellen gegeben (Wallen et al. 1982). Die Zelllyse bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembran für den roten Farbstoff und eine nachfolgende Anfärbung der Zell-DNA. Im Zuge der anschließenden, quantitativen Erfassung der Emissionen 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 (nicht-fragmentiertem) DNA-Gehalt unterscheidet.

Die Apoptoserate wurde nach einer Inkubationszeit von 18 h erfasst. Dafür wurden die Zellen zunächst aus ihrem Zellmedium entfernt, in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und anschließend für 1 h in 200 µl hypotoner Lösung mit PI bei 4 °C inkubiert. Als nächstes kam es zu einer prozentualen Erfassung der roten Fluoreszenzintensität der Zellkerne bei 585 nm im Zytometer (FACScalibur; BD Bioscience) (Nicoletti 1991), wobei pro Probe 10000 Zellen erfasst wurden. Alle Zellen die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht, wurden als apoptotische Zellen charakterisiert.

### **Propidiumiodid:**

Absorptionsspektrum: 536 nm

Emissionsmaximum: 617 nm

- färbt Nukleinsäuren

### **3.2.1.3 Kultivierung und Passagierung**

Die Kultivierung der Zellen (HL-60, Jurkat; RaJi, THP1; K562) fand ausschließlich in einer T 75er – Zellkulturflasche in 20 ml RPMI + 10% FCS + 1% P/S im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Die Zelldichte pro Flasche musste regelmäßig überprüft werden, gesplittet wurden die Zellen alle drei Tage auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro Flasche.

### **3.2.1.4 Vitalitätstest & Lebendzellzahlermittlung**

Für den Vitalitätstest und Lebendzellzahlermittlung konnte die Neubauer-Zählkammer verwendet werden. Das Deckgläschen wurde nach Befeuchten auf die Zählkammer geschoben, bis sich die sogenannten Newton'schen Interferenzringe ausbildeten. Anschließend wurden 10 µl der Zellen mit 30 µl Trypanblaulösung gemischt und 10 µl des Aliquots unter das Deckgläschen auf die Zählkammer pipettiert und im Mikroskop ausgezählt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff der durch die Membran von toten Zellen diffundieren kann und diese daraufhin blau anfärbt. Intakte, vitale Zellen bleiben hingegen ungefärbt. Nach dem Neubauer Prinzip wurden die äußeren, senkrechten 4 Kästchen von jedem der 4 Quadrate, die aus 4 x 4 Kästchen bestehen, ausgezählt (insgesamt 16 Kästchen). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand folgender Formel:

**Formel:**

**Anzahl gezählter Zellen x 4 x 10<sup>4</sup> = Zellzahl pro Milliliter**

### **3.2.1.5 Zellen auftauen**

Auf die Entnahme der Zellen aus dem Einfrierbehälter mit flüssigem Stickstoff und dem direkten Auftauen im Wasserbad (37°C), bis der Inhalt flüssig war, folgte die Resuspension der Zellen mit warmen RPMI + 10% FCS + 1% P/S Medium (2-3 ml) und Übernahme in ein 15 ml Falcon mit 10 ml Medium.

Nach einer Zentrifugation für 5 min und 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet wiederum mit 2-3 ml warmen RPMI + 10% FCS + 1 P/S resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche mit insgesamt 20 ml Volumen warmen RPMI + 10% FCS + 1 P/S überführt. Die Zellen inkubierten mindestens 2 Tage bevor sie das erste Mal gesplittet wurden.

### **3.2.1.6 Zellen einfrieren**

Die Kryokonservierung von Zellkulturen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gleicht einer Art Kältestarre, bei der alle Stoffwechselforgänge nahezu zum Stillstand kommen und dient der Langzeitaufbewahrung. Diese Methode erlaubt eine unbegrenzte Aufrechterhaltung der Vitalität der Zellen.

Die HL-60 Zellen wurden aus ihren Zellkulturflaschen entnommen und im sterilen Falconröhrchen 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Zellpellet mittels entsprechender Menge Einfriermedium (90 % FCS + 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert werden. Für eine schonende Abkühlung kamen die Zellen in ein Einfriergefäß (- 1°C / min) und wurden über Nacht bei - 80°C aufbewahrt, um am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden.

### **3.2.1.7 Ausdifferenzieren von HL-60 Zellen zu PMN-ähnlichen Zellen mittels ATRA**

ATRA (all-trans Retinolsäure/ Vitamin-A-Säure) oder auch Tretinoid genannt, leitet seine chemische Struktur von Vitamin A (Retinol) ab und wird als pharmazeutischer Wirkstoff in der Therapie von akuten Leukämien eingesetzt. ATRA führt über die

genetische Ebene zu einer Expansion und Ausreifung von Leukozyten-ähnlichen Zellen.

Die Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen fand in T75-Zellkulturflaschen statt. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 20 ml RPMI mit 10% FCS + 1% P/S Gesamtvolumen pro Flasche ausgesät und 1  $\mu$ M ATRA für die Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen hinzugegeben. Der Ansatz wurde 5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Beendigung der Ausdifferenzierung konnte die Apoptoserate mittels FACS-Analyse bestimmt, die Zellzahl neu ermittelt und die Zellen in einem Versuchsansatz verwendet werden.

### **3.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.2.2.1. Hitzeinaktivierung von Serum**

Für die Durchführung von einer Hitzeinaktivierung wurde 100  $\mu$ l gepooltes Serum (Tag 1-2 nach Trauma) von Traumapatienten in ein 1,5 ml Eppi abgefüllt und im Wasserbad bei 56 °C für 20 Minuten inkubiert. Parallel dazu, konnte als Kontrolle, ein weiteres Eppi mit 100  $\mu$ l gepooltem Serum 20 min auf Eis gestellt werden.

Das beschriebene Prozedere wurde auch bei 95 °C durchgeführt.

Nach Ablauf der 20 min konnten die neu hergestellten Proben direkt in einen Versuch mit frisch isolierten PMN eingesetzt oder im weiteren Verlauf bei -20 °C eingefroren werden.

#### **3.2.2.2 Ammoniumsulfatfällung**

Die Ammoniumsulfatfällung ist eine proteinchemische Methode zur Aufreinigung von Proteinen. Durch eine kontinuierliche Steigerung der Salzkonzentration in einer Lösung kommt es zu einer reversiblen Proteinfällung, indem durch das Salz (Ammoniumsulfat) die Hydrathülle an den Proteinen zerstört wird und diese präzipitieren.

Zunächst wurden auf Eis 10 Eppis, welche je 100  $\mu$ l gepooltes Traumapatienten-Serum enthielten, vorbereitet. Berechnet nach einem Nomogramm, kam es zu dem Hinzugeben der gewünschten Menge an Ammoniumsulfat entsprechend der zu

fällenden Konzentration. Dies wurde in 10er Schritten vorgenommen und dabei Fällungen von 10% bis 100% angefertigt (Abb.1). Nach Zugabe des Salzes zum Serum, wurden die Eppis gut gemischt und anschließend für 10 min auf Eis gestellt werden.

Im nächsten Schritt wurden die Proben dann 10 min bei 10000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und in einen Versuch eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
		Zuzugebende Menge in g/l																	
Anfangskonzentration Ammoniumsulfat	0	65	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	622	767	
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	522	
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	

**Abbildung 1 Nomogramm zur Berechnung der Ammoniumsulfatkonzentration**  
 Nomogramm zur Berechnung der Ammoniumsulfatkonzentration, die für eine bestimmte Menge an Gemisch zur Präzipitation, erforderlich ist.

### 3.2.2.3 Dialyse

Die Dialyse dient der Aufreinigung von Proteingemischen nach Teilchengröße. Das Repertoire umfasst 2 Systeme: Dialyseschläuche oder Dialysemembranen (Slide-a-Lyzer; Dialysis Cassettes) in verschiedenen Größen, genormt nach dem Molekulargewicht MWCO (Molecular Weight Cut Off).

Durch die semipermeablen Eigenschaften der Dialysesysteme kommt es zu einer selektiven Durchlässigkeit für verschiedene Ionen und Moleküle nach Größe, angetrieben durch den im ionenarmen PBS entstehenden osmotischen Sog. Es wurden in der folgenden Arbeit beide Systeme, Schlauch und Membran, verwendet.

Die Dialysemembran wurde trocken, bei RT gelagert und für den Zweck der Dialyse kurz vorher in PBS per Styroporschwimmer gehangen, um dann mit Hilfe einer Spritze mit dem zu dialysierenden Gemisch versehen zu werden. Der

Dialyseschlauch wurde bei 4°C in 10x PBS gelagert. Für die Durchführung der Aufreinigung wurde ein entsprechendes Stück, je nach Volumen der Probe, abgeschnitten und mit Knoten und Klammern verschlossen. Beide Systeme wurden nach Befüllung für 12-16 h in 5000 ml 1x PBS bei 4°C auf einem Magnetrührer gelagert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die nun dialysierten Proben der Membran/ Schlauch entnommen und im Versuch eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

### **Membran:**

2000 MWCO – 5-3 ml Versuchsvolumen

10000 MWCO – 0,5 -3ml Versuchsvolumen

20000 MWCO – 3 – 12 ml Versuchsvolumen

### **Schlauch:**

50000 MWCO – 0,5 – 12 ml Versuchsvolumen

### **3.2.2.4 Filtration**

Die Filtration dient der Probenaufreinigung. Es wurde 0,5 ml gepooltes Serum über eine Spritze ohne Kanüle in den 0,45 µm Filter (Millex®) von oben hineingegeben. Anschließend konnte das filtrierte Serum in einen Versuch eingesetzt oder bei -20°C eingefroren werden.

### **3.2.2.5 IgG Depletion**

Im humanen Serum sind große Mengen an Antikörpern, vor allem IgG (Immunoglobulin G), enthalten. Zur Entfernung von IgG aus humanem Serum wurden zunächst Protein G Plus/ Protein A Agarose Suspension-Beads (Calbiochem), die verschiedene Klassen von Immunoglobulinen binden, 15 min bei 4°C auf einem Roller durchmischt und anschließend im Verhältnis 1:10 zu der Probe hinzugeben (die Beads sollten mit abgeschnittener Pipettenspitze aufgenommen werden). Anschließend kam die Probe in einem 50 ml Falcon für mindestens 30-60

min bei 4°C auf einen Roller. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min bei 3000 rpm) mit anschließender Inkubation des Eppis für 5 min auf Eis. Der Überstand (das Serum) wurde in ein neues Eppi überführt und die im Pellet enthaltenen Beads, gebunden mit IgG, für weitere Untersuchungen in einem Western Blot aufbewahrt oder mittels Aufreinigung wieder verwendet.

Zur Aufreinigung der Beads erfolgte die Resuspension des Pellets in Glycinpuffer pH 2,7 (1 ml). Nach vollständiger Auflösung des Pellets in Glycin konnte die Probe 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert werden. Dieser Schritt erfolgte noch dreimal. Nach weiterem zwei maligem Waschen mit PBS waren die Beads wieder verwendbar. Die Lagerung fand in 1% PBS bei 4°C statt.

### **3.2.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test, eine photometrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific angewandt. Dabei wurden zu 10 µl verdünnter Probe (1:100 verdünnt in 1x PBS) 200 µl Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue hinzugegeben. Der Farbstoff geht mit den Seitenketten der Proteine Komplexbindungen ein, wodurch sich das Absorptionsspektrum des gebundenen Farbstoffes (595 nm) gegenüber dem freien Farbstoff (470 nm) verschiebt. Die damit verbundene Zunahme der Absorption bei 595 nm des Farbstoff-Protein-Komplexes, im Vergleich zum Standard, wird photometrisch als Maß für die Proteinkonzentration in der Probe gesehen.

### **3.2.2.7 SDS –PAGE (sodium dodecyl sulfatpolyacrylamid gel electrophoresis)**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung eines in bestimmter Konzentration aufgetragenen Proteingemisches nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld und ist der Durchführung der Western Blot Methode vorausgesetzt. Es wurden jeweils 5 µg Protein mittels der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, das aus einem Sammel- und ein Trenngel besteht, aufgetrennt (Laemmli 1970).

In einem ersten Schritt wurden die Proteine durch Zugabe von Laemmli-Puffer und Aufkochen bei 95°C für 8 min denaturiert und linearisiert. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches zu 5% im Laemmli-Puffer enthalten ist, sorgt zusätzlich zur Hitzedenaturierung von Tertiär-, Sekundärstrukturen und Wasserstoffbrückenbindungen, für eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen mittels seiner Thiol-Gruppe.

Gleichzeitig bindet das anionische Detergens SDS, als ein weiterer Bestandteil des Laemmli-Puffers, an die hydrophoben Regionen der Polypeptidketten und überdeckt dadurch die Eigenladung der Proteine. Die auf diese Weise negativ aufgeladenen Peptidketten wandern in einem elektrischen Feld Richtung Anode und werden somit entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Kleine Proteine wandern im Gelgitter schneller und große Proteine langsamer, somit wurde je nach Proteingröße die Porenweite des Geles ausgewählt (Hashimoto et al. 1983).

Das Trenngel wurde zunächst zwischen 2 Glasplatten gegossen und für einen graden Übergang mit 70% Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisationszeit von 15-20 min wurde das Ethanol durch das Sammelgel ersetzt und das nun fertige Gel mit Kamm konnte im ausgehärteten Zustand mit den vorbereiteten Proteinproben beladen werden.

Die Mengenangaben der Gelbestandteile:

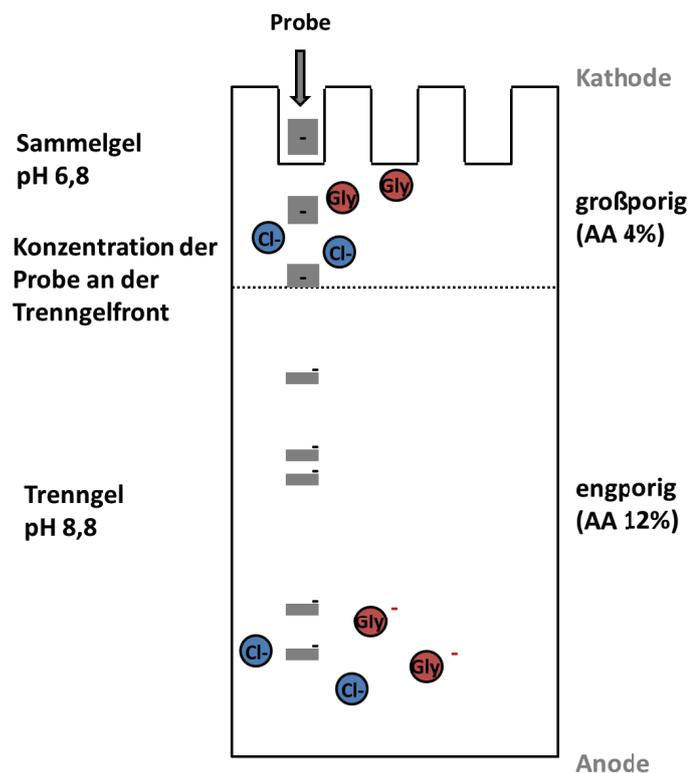
1 Gel: 1,5 mm	10% Trenngel	4% Sammelgel
30%	2,5 ml	650 $\mu$ l
Acrylamid	1,875ml	1,25ml
4x Puffer	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
H <sub>2</sub> O	3,125 ml	3 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
10% APS	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l

Die Gellaufkammer (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad) wurde mit 1x Laufpuffer aufgefüllt und an 60 V angeschlossen, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Im Trenngel wurde anschließend mit 120 – 140 V gearbeitet, die Page konnte mit Auslaufen der Proben aus dem Gel gestoppt werden.

Im Sammelgel, der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, befinden sich große Poren und Chloridionen mit größerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit als die der aufgetragenen Proteine (Abb. 2). Hinzu kommen die neutralen Glycinionen mit dem Elektrophoresepuffer, die langsamer als die Proteine (Folge-Ionen) wandern und somit in Kombination mit den Chloridionen (Leit-Ionen) eine Zone hoher elektrischer Feldstärke zwischen sich erschaffen, die die Proteine der Probe zwischen den Feldstärkegradienten sammeln und sie zu einer Proteinbande formen und zur Trenngelfront wandern lassen. Dies ist der sogenannte „*stacking effect*“ der zu einer Fokussierung der Proteine am Trenngel führt und die Auflösung im Trenngel erheblich verbessert (Abb. 2).

Durch den pH-Swift zwischen Sammel- (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8) erhalten die Glycin-Ionen eine negative Nettoladung und überholen die makromolekularen Anionen wodurch der Feldstärkegradient aufgehoben wird und die Proteine nach ihrer molaren Masse im engporigem Trenngel aufgetrennt werden (Schägger und Jagow 1987).

Nach ungefähr 1-2 Stunden war die Beendigung der Auftrennung erreicht, das Gel wurde in Aqua dest gespült und kurz darauf in Transferpuffer für 15 min äquilibriert und damit auf das „*Blotting*“ vorbereitet.



**Abbildung 2 Eine schematische Darstellung der SDS-Page**

Die SDS-PAGE dient der elektrischen Auftrennung eines Proteingemisches nach ihrer Molekülmasse und ist der Durchführung der Western Blot Methode vorausgesetzt.

### 3.2.2.8 Western Blot

Der Zweck dieser Methode ist der Transfer und Erhalt des Musters von elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemischen von einem Gel auf eine Trägermembran (Nitrocellulosemembran, 0,2 µm Porengröße).

Per Semi-Dry-Blotting Verfahren wurde bei 23 V über 2 Stunden die Proteine im Gel auf eine Membran transferiert (Kyhse-Andersen 1984). In einer „sandwich-Formation“ liegt das Gel auf der Membran, senkrecht ausgerichtet zum elektrischen Feld. Dabei war die mA Einstellung nach der Faustregel  $1,5 \text{ mA/cm}^2$  zu wählen. Der Transfer konnte mittels Ponceau S-Färbung überprüft werden. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit Wasser und im Anschluss mit TBS/0,1% Tween20.

Zur weiteren Feststellung der Effizienz des Transfers wurde zusätzlich das Gel in Coomassie-Lösung gelegt und für 30 min auf dem Schüttler gefärbt mit anschließender Entfärbung mit Entfärb-Lösung bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

Im nächsten Schritt folgte die Blockierung der Membran für 60 min bei RT mit 5% BSA. Nachfolgend fand die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Antikörper (goat-anti Human IgG) in TBS/ 0.1% Tween-20 in einer Verdünnung von 1:1000 für 1 h bei RT statt. Anschließend folgten drei Waschschrte mit TBS + 0.1% Tween-20. Schließlich wurden die Proteine mittels Chemilumineszenz (Pierce® ECL Western Blotting Substrat, Thermo, Dreieich, Deutschland) detektiert und densitometrisch (Molecular Imager Chemi Doc XRS; Programm Quantity One, BioRad) quantifiziert.

### **3.2.2.9 Silberfärbung von SDS-Gelen**

Zur Darstellung der aufgetrennten Proteinanteile in einer SDS-PAGE kann die Silberfärbung genutzt werden. Zunächst wurde das fertige Gel in der Fixierlösung für mindestens 30 min geschwenkt, wobei alle 20 min die Fixierlösung erneuert wurde. Anschließend wurde das Gel mit Waschlösung (zweimal je 20 min) und ddH<sub>2</sub>O (einmal 30 min, dabei alle 10 min ddH<sub>2</sub>O auswechseln) gereinigt. Für die weiteren Schritte ist die Arbeit im Kühllabor (4°C) notwendig. Das Gel wurde für 1 min mit der Sensitizer-Lösung bedeckt und dann in Ag-Lösung (zweimal jeweils 30 sec) getaucht, mit anschließend kompletter Entfernung der Ag-Lösung und ddH<sub>2</sub>O Reinigung des Gels, dreimal je 15 sec. Dann wurde die Entwickler-Lösung über das Gel gegeben, bis die Proteinbanden sich deutlich darstellten. Abschließend wird der Färbeprozess mittels ddH<sub>2</sub>O Spülung und der Hinzugabe von 5%iger Essigsäure für 5 min abgestoppt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C in Essigsäure (1%).

### **3.2.2.10 Chromatographie**

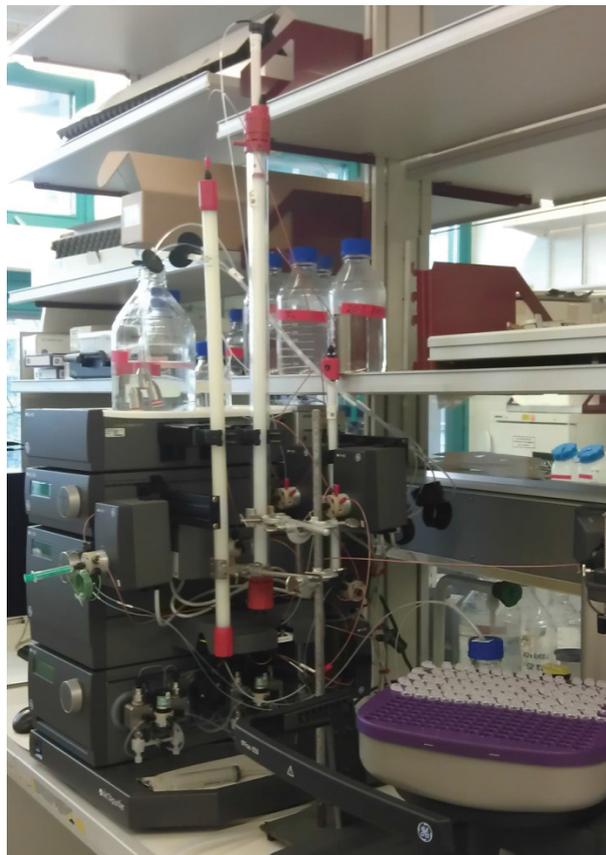
Die Chromatographie ist ein bevorzugtes Verfahren zur Proteinaufreinigung. Mittels eines geschlossenen Säulensystems ist es möglich endotoxin- und pyrogenfreies Protein, das in der Zellkultur eingesetzt werden kann, nach bestimmten Charakteristika aufzutrennen.

Die Methodik besteht aus einer Säule mit dem zur Auftrennung nötigem Material, einer Pumpe, die den jeweiligen Puffer mit Probe gleichmäßig durch das

Säulensystem spült und einem Detektor der am Ausgang der der Säule das eluierte Protein durch die Messung der Absorption bei 280 nm graphisch erfasst (Abb. 3).

Das durchgeflossene, wie gelöste Protein wurde in Fraktionen gesammelt und konnte im Einzelnen auf seine Aktivität hin untersucht werden.

Die Affinitätschromatographie ist ein versuchsintensiver Ansatz. Bei selbst hergestellten Versuchsmaterialien müssen die Bedingungen für die effektive Bindung und Elution ausgetestet und normiert werden (Urh et al. 2009).



**Abbildung 3 ÄKTapurifier Chromatographiesystem**

### **3.2.2.11 Albumin Depletion**

Die Albumin Depletion wurde mit einer HiTRAP Blue Säule (Riue Hp 5 ml; GE) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Der benötigte Bindungs- und Elutionspuffer wurde nach Anleitung hergestellt und mittels 2 maliger Filtration (0,45  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ ) vor Gebrauch aufgereinigt.

Die Säule wurde nach ordnungsgemäßem Einbau in den Äktapurifier, GE und 5maligem Waschen mit ihrem maximalen Volumen (insgesamt 25 ml Bindungspuffer) gespült und im Anschluss mit dem Serum beladen. Die Laufzeit betrug 2-2,5 Stunden und es wurden 12-13 Fraktionen gespalten. Allgemein wurde eine Geschwindigkeit von 0,2-0,3 ml/ min gewählt, wobei der Druck nicht 0,3 MPa überschritten hatte.

### **3.2.2.12 Gelfiltration zur Größenauftrennung**

Die Gelfiltration wurde mittels einer Superose 6 10/ 300 GL Säule nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit 0,5 ml /min konnte die Flussgeschwindigkeit gewählt werden, wobei darauf geachtet werden musste einen Säulendruck von 1,5 MPa nicht zu überschreiten.

Die aufgetragene Konzentration betrug 150 µg Protein in 100 µl Volumen, welche mit einem Verdünnungsfaktor von 1:300 auf 36 Fraktionen, nach der Größe, aufgetrennt wurde.

### **3.2.3 Statistische Analysen**

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Für die statistische Auswertung der Daten wurde, wenn nicht anders angegeben, ANOVA angewandt.

Alternativ wurde der Student's t-Test (unabhängige Proben) verwendet.

$P < 0,05$  gilt als signifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Das Serum polytraumatisierter Patienten hemmt die spontane PMN-Apoptose und induziert eine intrinsische Apoptoseresistenz

Vorhergegangene Ergebnisse externer und der Labor-Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass im Vergleich zu PMN gesunder Probanden sich PMN aus Polytrauma-Patienten durch eine verlängerte Lebensspanne auszeichnen. Verantwortlich für die verzögerte Apoptoserate der PMN sind Wachstumsfaktoren und Zytokine, die in erhöhten Konzentrationen im Serum polytraumatisierter Patienten zu finden sind (Dinarello 2000).

Die Verzögerung der Apoptose der PMN aus Patienten nach einem schweren Trauma ist durch eine gestörte intrinsische Apoptose bedingt, welche proportional mit einer erhöhten Proteinkonzentration von Mcl-1, einem antiapoptotisch wirkenden Faktor, einhergeht. (Die Inkubation von PMN gesunder Probanden mit dem Serum polytraumatisierter Patienten bewirkt in diesen Zellen eine spontane und verzögerte, unter anderem Mcl-1 induzierte, intrinsische Apoptoseresistenz (Paunel-Gorgulu et al. 2009).

Frisch isolierte PMN gesunder Probanden, humane promyelozytisch-leukämische Zellen (HL-60 Zellen) und mittels ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden steril in einer 48-*well*-Platte in der Konzentration  $2 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät. Als Medium wurde RPMI + 1% P/S verwendet und pro *well* ein Mediumvolumen von 300  $\mu$ l eingesetzt. Um die antiapoptotische Serumaktivität zu überprüfen, wurden die jeweiligen Zellen mit dem zu untersuchendem Serum (1%) und FCS (1%) vorbehandelt. Nach einer Stunde wurde Staurosporin (STS; 0,2  $\mu$ M), ein Induktor der zellulären intrinsischen Apoptose, hinzugegeben und über Nacht mit den Zellen inkubiert. Proben ohne STS wurden als Kontrollen eingesetzt, um die physiologische Apoptoserate der Zellen zu erfassen. Nach 18 h Inkubationszeit erfolgte die Bestimmung der prozentualen Apoptoserate der Zellen mittels FACS Analyse nach dem Protokoll der PI Färbung.

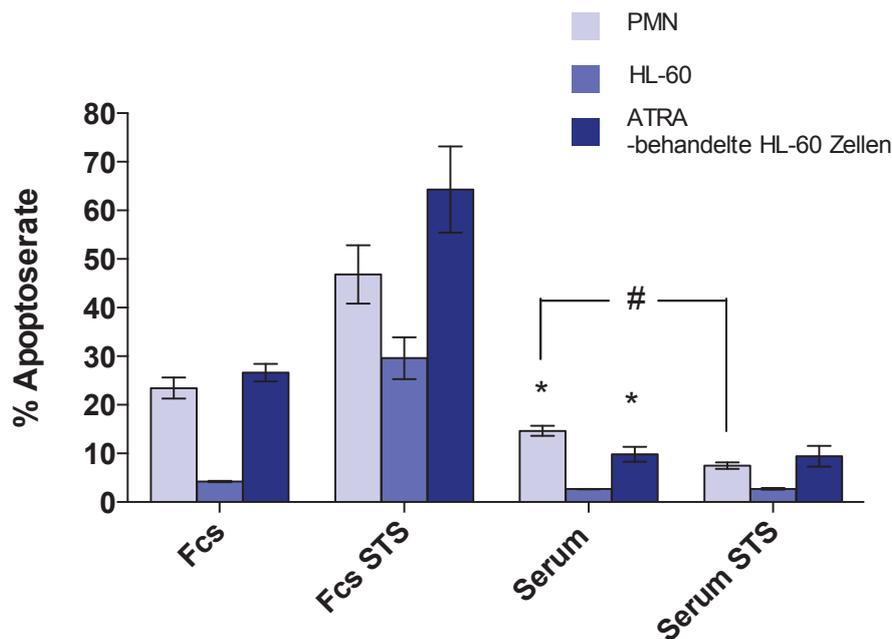
In Abb. 1 wird ersichtlich, dass PMN behandelt mit Patientenserum eine signifikant verminderte Apoptoserate im Vergleich zu PMN kultiviert in Anwesenheit von FCS (Kontrolle) aufwies. Weiterhin zeigte sich in Gegenüberstellung der Apoptoseraten von PMN inkubiert mit FCS und STS oder mit Serum und STS, dass es zu einem deutlich vermehrten Zelltod in den mit FCS vorbehandelten PMN, jedoch zu keiner signifikanten Anhebung der Apoptoserate in PMN inkubiert mit Serum kommt. Hier schien die Apoptoserate unter STS Wirkung eher rückläufig zu sein und die proapoptotische Wirkung des Zellgiftes aufgehoben.

Diese zwei Serum-bezogenen Wirkungen nach einem Trauma wurden an weiteren Zellreihen der myeloischen Zelllinie ausgetestet (Abb. 1).

In HL-60 Zellen, kultiviert in Anwesenheit von Serum, kommt es zu einer deutlich verzögerten Apoptoserate und auch zu keiner weiteren Anhebung nach STS-Zugabe, im Vergleich zu der Kontrolle (FCS).

Die mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen, die als Modell für PMN etabliert sind, bestätigen die im Versuch signifikant verlängerte Lebensspanne und STS Resistenz in Anwesenheit von Serum. Eine signifikante Abnahme der Apoptose in Anwesenheit von Serum und STS konnte jedoch nur in primären PMN ausgemacht werden. Dieser Effekt wurde weder in HL-60 noch in ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen beobachtet.

Die durch die Seren polytraumatisierter Patienten in PMN, HL-60 Zellen und ausdifferenzierten ATRA-behandelten HL-60 Zellen induzierten Effekte deuteten darauf hin, dass protektiv wirkende antiapoptotische Faktoren nach einem Trauma aktiviert oder gebildet werden, die zum einem den physiologischen Zelltod hemmen und im Weiteren eine STS Resistenz begünstigen.



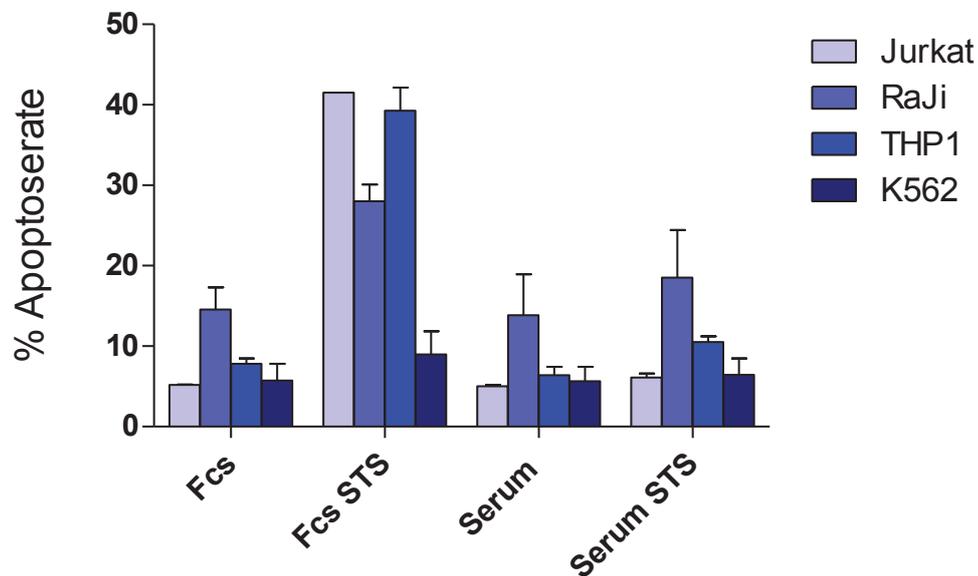
**Abbildung 1 Verzögerte Apoptoserate und intrinsische Apoptoseresistenz in myeloiden Zellen in Anwesenheit von Serum polytraumatisierter Patienten.**

PMN von gesunden Spendern, HL-60 Zellen und ATRA-behandelten HL-60 Zellen wurden in An- und Abwesenheit von STS mit einem Serumpool polytraumatisierter Patienten (Tag 1-3 nach Trauma; 1%) inkubiert. Nach 18 stündiger Inkubationszeit wurde die prozentuale Apoptoserate mittels PI-Färbung und FACS Analyse ermittelt. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zu der Kontrolle ohne STS (FCS); #  $p < 0,05$ . PMN: N=14, HL-60 Zellen: N=3; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N=6

Am Anfang der Leukopoese steht die pluripotente Stammzelle, von der sich die myeloische und die lymphatische Zelllinie ableitet. Um zu untersuchen, ob die intrinsische Apoptoseresistenz Zelltyp-spezifisch ist, wurden immortalisierte T-Lymphozyten-ähnliche Jurkat- und B-Lymphozyten-ähnlichen RaJi-Zellen mit einem repräsentativen Patienten-Serumpool (Tag 1-3) und FCS jeweils in 1%iger Konzentration vorbehandelt und nach einstündiger Inkubationszeit mit  $0,2 \mu\text{M}$  STS versetzt. Zum Vergleich wurden die Versuche parallel mit den immortalisierten Monozyten-ähnlichen THP1 Zellen und K562 Zellen des myeloischen Astes durchgeführt.

Die in Anwesenheit von Serum kultivierten Jurkat- und RaJi-Zellen wiesen eine gleichermaßen sichtbar erniedrigte Apoptoserate, im Vergleich zu den Zellen der myeloischen Zellreihe (K562; THP1) behandelt mit Serum, auf (Abb.2). Nach Hinzugabe von STS konnte in allen Zelltypen eine vergleichbare Apoptoseresistenz

wie in PMN und PMN-ähnlichen Zellen beobachtet werden. Somit ist die beobachtete intrinsische Apoptoseresistenz für Zellen der myeloiden Linie ebenso relevant wie für Zellen der lymphatischen Linie.



**Abbildung 2 Serum von Patienten mit einem schweren Trauma bewirkt eine intrinsische Apoptoseresistenz in myeloiden und lymphatischen Zellen.**

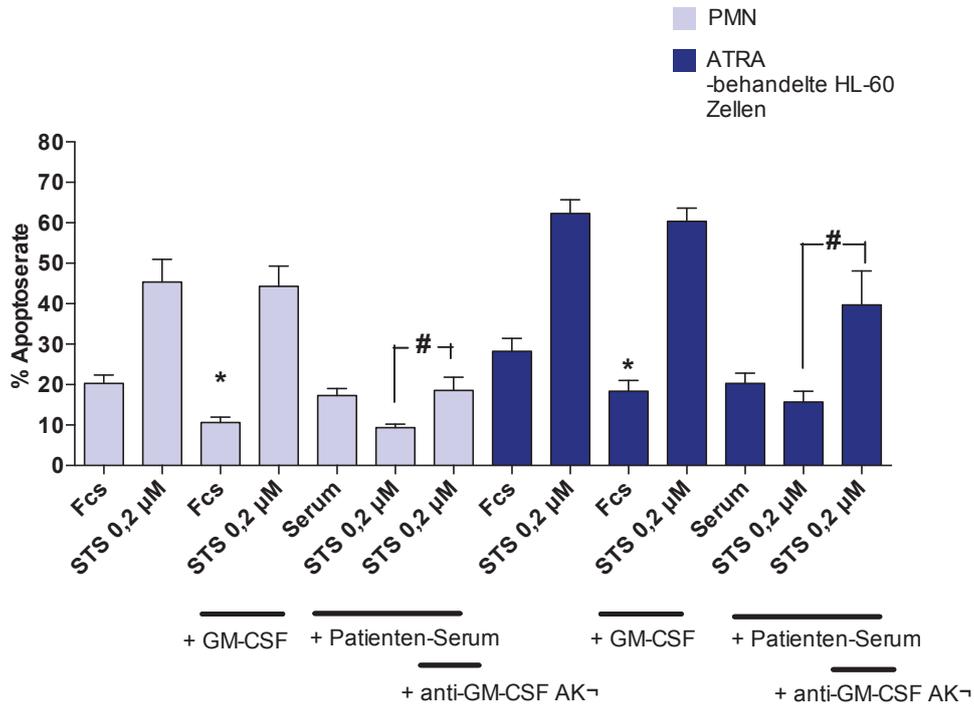
Jurkat- und RaJi- Zellen der lymphatischen Zelllinie und THP1- und K562- Zellen der myeloischen Zelllinie wurden mit gepooltem Serum von polytraumatisierten Patienten (Tag 1-3; 1%) und FCS (1%), in An- und Abwesenheit von STS (0,2  $\mu$ M), kultiviert über 18 h und anschließend die Apoptoserate der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. RaJi, THP1, K562 N=3; Jurkat N=2.

## **4.2 GM-CSF aus dem Serum polytraumatisierter Patienten ist ein Kofaktor in der Induktion der intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN**

Für ein verbessertes Verständnis der zusammenwirkenden Faktoren hinsichtlich der antiapoptotischen Aktivität des Serums von Patienten nach einem schweren Trauma, wurde der Einfluss von GM-CSF auf die STS-Resistenz getestet. Es konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden, dass GM-CSF in der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz involviert zu sein scheint (Paunel-Gorgulu et al. 2009).

Frisch isolierte PMN von gesunden Spendern und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden in Anwesenheit von FCS (1%) und 50 ng/ml GM-CSF oder Patientenserum (1%) für 1 h vorinkubiert und anschließend mit STS (0,2  $\mu$ M) über Nacht behandelt. Um den Einfluss von GM-CSF auf die STS-Resistenz zu untersuchen, wurde die biologische Aktivität des Zytokins im Patientenserum mittels spezifischen anti-GM-CSF Antikörpern (1  $\mu$ g/ml) neutralisiert. Die quantitative Auswertung der Apoptose in Abbildung 3 zeigt, dass die Neutralisation von GM-CSF in Patienten-Serum zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptose in den Zellen nach STS-Behandlung führt, im Vergleich zur Apoptose in PMN, die nur in Anwesenheit von Serum kultiviert wurden. Dieses Ergebnis ließ sich gleichermaßen mit in ATRA-behandelten HL-60 Zellen reproduzieren. Obwohl die Hemmung der GM-CSF Aktivität im Serum durch den eingesetzten Antikörper einen proapoptotischen Effekt hat, scheint rekombinantes GM-CSF alleine keine intrinsische Apoptoseresistenz zu induzieren. So war die Apoptoserate in PMN kultiviert in Anwesenheit von FCS und STS vergleichbar hoch, unabhängig von der Anwesenheit von GM-CSF (50 ng/ml). Dennoch zeigen die Zellen, die mit GM-CSF behandelt wurden, eine deutlich verminderte spontane Apoptoserate.

In Zusammenschau der Ergebnisse wird deutlich, dass rekombinantes GM-CSF eine verlängerte Lebensdauer bewirken kann, ohne gleichzeitig einen STS-Resistenz in PMN und ATRA-behandelten HL-60 Zellen auszulösen. Jedoch ist die STS-Resistenz des Serums traumatisierter Patienten in Anwesenheit von GM-CSF-AK signifikant vermindert.

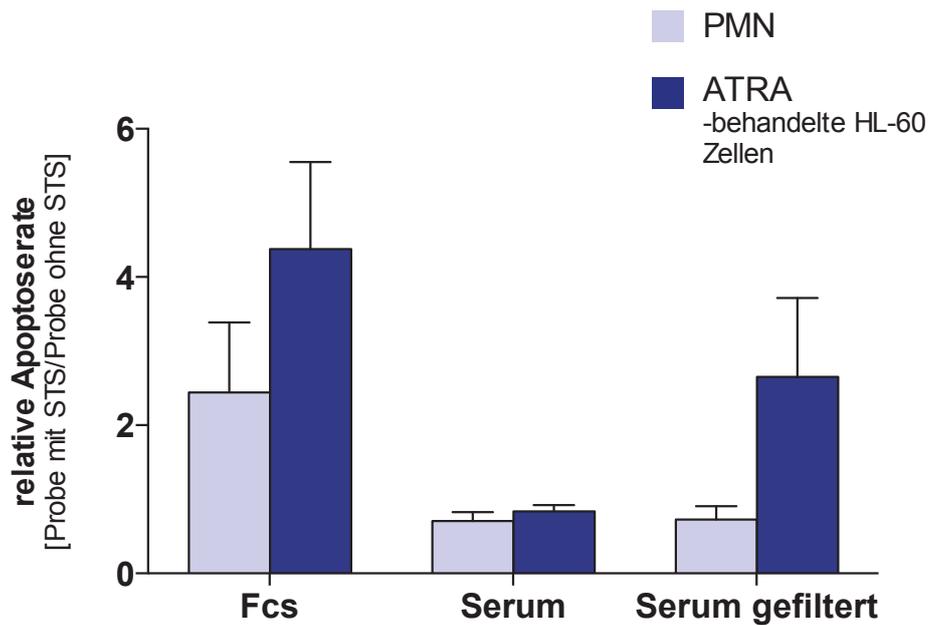


**Abbildung 3 GM-CSF ist an der Serum-induzierten antiapoptotische Wirkung von STS in PMN beteiligt.**

In Anwesenheit von FCS (1%), FCS + GM-CSF (1%+50 ng/ml) oder Serum + Anti-GM-CSF AK (1%+ 1 µg/ml) kultivierten PMN, isoliert von gesunden Spendern, und ATRA-behandelten HL-60 Zellen wurde nach einstündiger Vorbehandlung STS (0,2 µM) hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde mittels FACS-Analyse die Apoptoseraten der Zellen ermittelt. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. \*p < 0,05 im Vergleich zu der Kontrolle (FCS), # p < 0,05. PMN N= 10; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N= 10.

## **4.3 Kleinmolekulare Serumproteine schützen nicht vor STS-induzierter Apoptose**

Mit dem Ziel die Serumfaktoren, welche für eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma verantwortlich sind, einzugrenzen, wurde ein repräsentativer Serumpool (Tag 1-3) unter Zuhilfenahme einer 1 ml Spritze auf einen 0,45 µm Proteinfiter gegeben und aufgereinigt. An PMN gesunder Probanden und mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen wurde die Wirkung des gefilterten Serumüberstandes in 1%iger Konzentration, im Hinblick auf dessen Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen ausgetestet. Nach einstündiger Vorbehandlung der Zellen mit der gewonnenen Serumfraktion, wurde 0,2 µM STS hinzugegeben und die Zellen über 18 h inkubiert. In Abbildung 4 ist die mittels FACS-Analyse bestimmte Apoptoserate nach STS-Behandlung, relativ zur unbehandelten Probe, dargestellt. Wie bereits in Abbildung 1 gezeigt, weisen myeloide Zellen, die in Anwesenheit von Patienten-Serum kultiviert wurden, im Vergleich zu der Kontrolle eine signifikant geringere Apoptoserate gepaart mit einer STS-Resistenz auf. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der relativen Apoptose von PMN, kultiviert mit Patienten-Serum, zu jenen mit der gefilterten Serumfraktion festgestellt werden. Dieses Ergebnis ließ sich gleichermaßen in ausdifferenzierten ATRA-behandelten HL-60 Zellen reproduzieren. Die antiapoptotische Aktivität ist auch nach Ausschluss kleinmolekularer Proteine aus dem Patienten-Serum erhalten.



**Abbildung 4 Kleinmolekulare Proteine aus dem Serum polytraumatisierter Patienten induzieren keine intrinsische Apoptoseresistenz in myeloiden Zellen.**

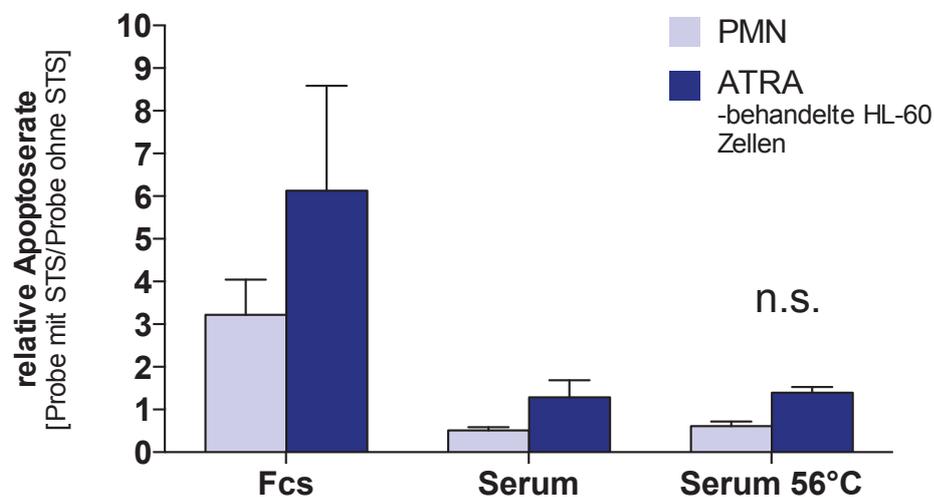
Quantifizierung der relativen Apoptose von Zellen kultiviert in Anwesenheit von einem repräsentativen Serumpool (Tag1-3) vorbehandelt mit einem 0,45  $\mu\text{m}$  Filter. Zu PMN und ATRA-behandelten HL-60 Zellen wurde FCS, Serum oder gefiltertes Patienten-Serum (je 1%) jeweils mit und ohne STS hinzugegeben. Nach 18 stündiger Inkubationszeit erfolgte mittels FACS-Analyse die Quantifizierung der Apoptose. Es ist die relative Apoptoserate nach STS Behandlung, im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. n.s. = nicht signifikant. PMN: N= 7; N=3; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N= 4.

#### 4.4 Die Serumfaktoren die eine STS-Resistenz in PMN nach Trauma vermitteln sind hitzestabil

Für die gezielte Isolation der Serumfaktoren, welche für eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma verantwortlich sind, wurde ein repräsentativer Patienten-Serumpool (Tag 1-3) über 20 min in einem Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert.

Kontroll-PMN gesunder Probanden und ATRA-behandelte HL-60 Zellen wurden mit Serum (1%) und hitzeinaktiviertem Serum (1%) des gleichen Pools vorbehandelt und nach einer Stunde mit 0,2 µM STS über Nacht inkubiert.

Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass die Hitzeinaktivierung des Serums keinen Einfluss auf die intrinsische Apoptoseresistenz hat. In PMN und mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen kommt es in Anwesenheit von hitzeinaktiviertem Serum weiterhin zu einer verminderten relativen Apoptose nach STS-Behandlung, die nahezu identisch mit der Apoptoserate der Kontrollfraktion (Serum) ist. Diese Beobachtung lässt auf eine Hitzestabilität der gesuchten Serumfaktoren schließen.

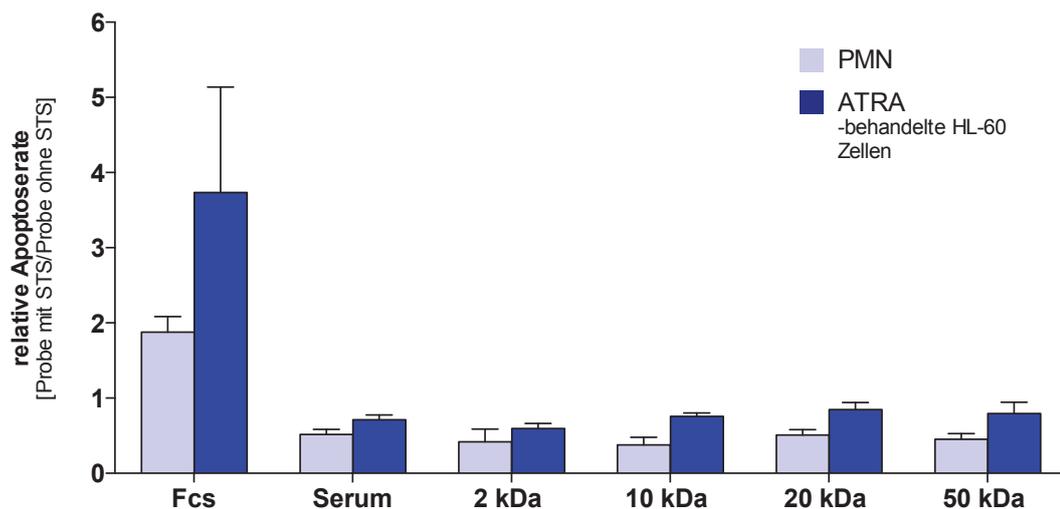


**Abbildung 5 Die für eine intrinsische Apoptoseresistenz nach Trauma verantwortlichen Serumfaktoren sind hitzestabil**

Ein repräsentativer Serumpool von Patienten nach einem schweren Trauma (Tag 1-3) wurde über 20 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt und mit frisch isolierten PMN gesunder Probanden und ATRA-behandelten Zellen in 1%iger Konzentration kultiviert. Nach einer Stunde wurde zu den Versuchsansätzen STS (0,2 µM) hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die relative Apoptoserate mittels FACS-Analyse ermittelt. Es ist die relative Apoptoserate nach STS Behandlung, im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. n.s. = nicht signifikant. PMN:N=15; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N=4.

#### 4.5 Das Molekulargewicht der Serumfaktoren die eine STS-Resistenz in PMN nach Trauma vermittelt liegt über 50 kDa

In einem weiteren Versuchsansatz wurden vier Fraktionen von einem repräsentativen Serumpool (Tag 1-3) über 14-16 h in PBS (1x), umschlossen von einer semipermeablen Dialysemembran mit 2, 10, 20 oder 50 kDa großen Poren, unter Rühren und stetiger Kühlung dialysiert. Nach Abschluss der Behandlung enthielten die Größen-dialysierten Proteingemische jeweils nur noch größere Bestandteile als die angegebene Porengröße. Anschließend wurden die vier neu generierten Serumproben mit frisch isolierten PMN von gesunden Spendern und mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen in 1%iger Konzentration kultiviert. Nach einer Stunde Vorbehandlung mit den Serumfraktionen wurde zusätzlich noch 0,2  $\mu$ M STS hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Nach Ablauf von 18 h konnte die Apoptoserate der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden (Abb. 6). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der relativen Apoptose zwischen der Kontrolle (Serum) und den jeweiligen gewonnen dialysierten Serumfraktionen in PMN sowie in den PMN-ähnlichen ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen gibt. Anhand der Auswertung lässt sich rückschließen, dass die gesuchten Faktoren in einem Größenbereich über 50 kDa liegen müssen.



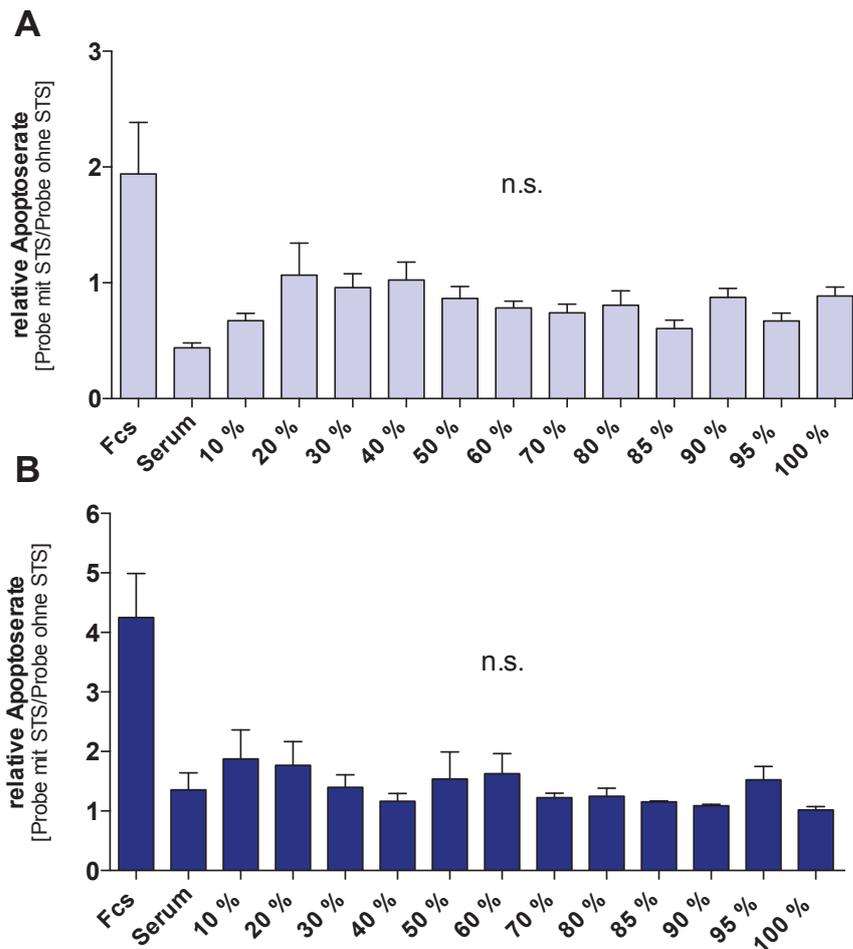
**Abbildung 6 Serumfaktoren, die eine STS-Resistenz nach Trauma in PMN vermitteln, liegen in einem Größenbereich über 50 kDa**

Bestimmung der antiapoptotischen Aktivität von Serum polytraumatisierter Patienten nach Ausschluss kleinmolekularer Proteine, mittels verschieden großen Dialysemembranen (2 bis

50 kDa). Die vier neu gewonnenen Serumfraktionen (1%) wurden jeweils mit frisch isolierten PMN und ATRA-behandelten HL-60 Zellen in An- und Abwesenheit von STS (0,2  $\mu$ M) über 18 h kultiviert. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS-Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. PMN: N=3-11; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N=3.

## **4.6 Das Zusammenspiel mehrerer Faktoren im Serum polytraumatisierter Patienten induziert eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN**

Zur gezielten Isolierung der für die STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma verantwortlichen Serumfaktoren, wurde eine Fraktionierung der Serumproteine entsprechend ihrer Löslichkeit mittels Ammoniumsulfat durchgeführt. Die Fällung eines repräsentativen Serumpools (Tag 1-3 nach Trauma) erfolgte prozentual aufsteigend in 10er Schritten auf insgesamt 12 Fraktionen und spaltete jeweils eine 100  $\mu$ l Probe des eingesetzten Serumpools in Überstand (nicht ausgefällte Serumbestandteile) und Pellet (an Ammoniumsulfat gebundene Serumproteine). Frisch isolierte PMN und mittels ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen wurden, eine Stunde nach Zugabe des Überstandes der neu gewonnenen Serumfraktionen (1%), mit 0,2  $\mu$ M STS über Nacht kultiviert. Nach Ablauf der 18 h Inkubationszeit wurde durchflusszytometrisch die Apoptoserate der Zellen gemessen (Abb.7). Die relativen Apoptoseraten nach Behandlung von PMN und ATRA-differenzierten HL-60 Zellen mit den einzelnen Fraktionen 10%-100% zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Serum), denn die Apoptoseraten sind untereinander durchgehend von ähnlichem Niveau (Abb. 7, A, B). Dieses Ergebnis konnte in beiden Zelltypen festgestellt werden. Dabei führte die Kultivierung von PMN mit der Serumfraktion 20% zu der höchsten und die Serumfraktion 85% zu der niedrigsten Apoptoserate. Die Probe 10% löste in ATRA-behandelten HL-60 Zellen die höchste und die Serumprobe 90% die niedrigste relative Apoptose aus (Abb. 7, B). Die Ergebnisse belegen, dass sich die zu ermittelnde Aktivität nicht eindeutig in einer Fraktion festhalten lässt. Des Weiteren ist die sukzessive Verteilung der antiapoptotischen Wirkung der Überstände ein Indiz für eine mögliche Beteiligung von mehreren Serumfaktoren an der intrinsischen Apoptoseresistenz.



**Abbildung 7 Mehrere Serumfaktoren sind an der STS-Resistenz in PMN nach Trauma beteiligt.**

Die Proteine eines repräsentativen Serumpools (Tag 1-3) wurden nach ihrer Löslichkeit, mittels Ammoniumsulfat prozentual aufsteigend, in 12 Fraktionen aufgespalten.

PMN (A) und ATRA-behandelte HL-60 Zellen (B) wurden mit dem Überstand der gewonnenen Serumproben in An- und Abwesenheit von STS (0,2  $\mu$ M) über Nacht inkubiert. Nach 18 h wurde die relative Apoptoserate der Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS-Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. n.s. = nicht signifikant, im Vergleich zu der Kontrolle (Serum). PMN: N=6; ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N=7.

Parallel zu der Überprüfung des Überstandes der Ammoniumsulfat-Fällungen (Abb. 7) wurden die ausgefällten Proteine im Pellet der zwölf generierten Proteinfractionen, jeweils in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und auf ihre Aktivität zur Induktion einer STS-Resistenz bzw. intrinsischen Apoptoseresistenz in myeloiden Zellen getestet. Die zwölf prozentual und stufenweise ausgefällten Serumfraktionen (10-100%) wurden in 1%iger Konzentration mit frisch isolierten PMN und mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen kultiviert. Nach einstündiger Vorbehandlung mit den ausgefällten Faktoren, wurden die Zellen mit 0,2  $\mu$ M STS behandelt und

über Nacht inkubiert. Nach Ablauf von 18 h wurde mittels FACS Analyse und P Färbung die Apoptoserate der Zellen ermittelt (Abb.8).

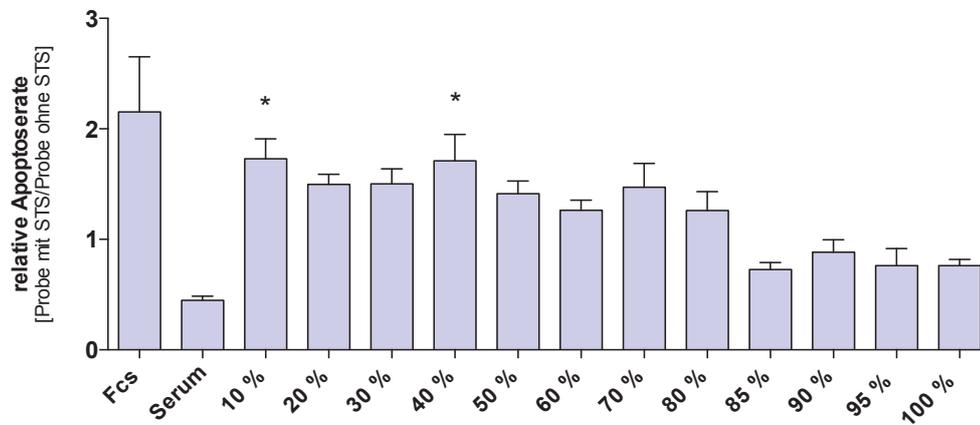
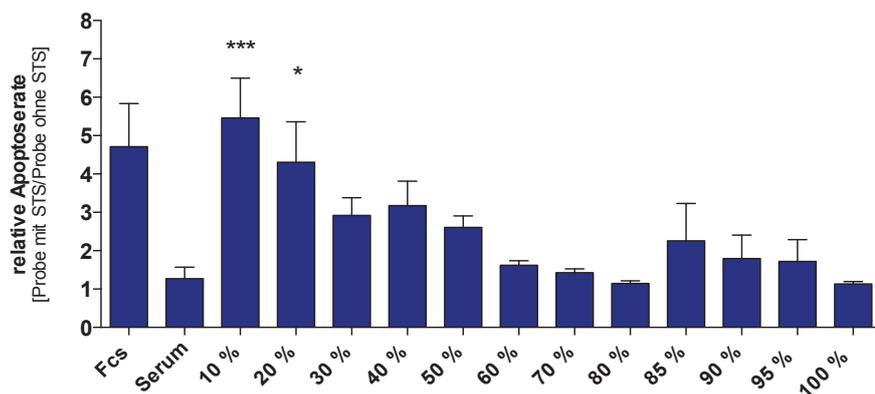
Die Inkubation mit den ursprünglich ausgefällten Proteinfractionen und die anschließende Zugabe von STS führte in PMN zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate in den Fraktionen 10-80%, im Vergleich zu der Kontrolle, die in Anwesenheit von unbehandeltem Serum kultiviert wurde. Dabei wies vor allem die Behandlung von PMN mit den Fraktionen 10% und 40% eine signifikant gesteigerte relative Apoptose auf. Diese erhöhte STS-Sensitivität der Zellen spricht für ein Fehlen der gesuchten antiapoptotisch wirkenden Serumfaktoren in den ursprünglichen Pellets. Im Gegensatz dazu wiesen die verbliebenden vier Proben 85-100% eine mit der Kontrolle vergleichbare, geringe Apoptoseraten auf, sodass hier die Anwesenheit der Faktoren weiterhin vermutet werden kann (Abb.8, A).

In ATRA-behandelten HL-60 Zellen führte die Behandlung mit den ausgefällten Proteingemischen und anschließenden Kultivierung mit STS zu vergleichbaren Ergebnissen. Hier wiesen die Fraktionen 10% und 20% eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu der Kontrolle (Serum) auf. Die Inkubation mit den Fraktionen 60%, 70%, 80% und 100% haben im Vergleich zur Kontrollprobe ähnliche Apoptoseraten in ATRA-differenzierten HL-60 Zellen bewirkt (Abb. 8, B).

Die Ergebnisse stellen die Ergänzung zu Abbildung 7 dar. In PMN und ATRA-behandelten HL-60 Zellen kam es nach Inkubation mit prozentual höher ausgefällten Fraktionen (70-100%) im Vergleich zu den Serumfraktionen (10-60%) zu einer tendenziell niedrigeren Apoptoserate.

Der für die intrinsische Apoptoseresistenz nach Trauma verantwortliche Serumbestandteil konnte somit partiell im prozentual höher gefällten Bereich (85%-100%) ausfindig gemacht werden.

In Zusammenschau der Abbildungen 7 und 8 konnte die gesuchte Serumaktivität in keiner einzelnen Fraktion alleinig isoliert werden, es kam jeweils zu einer sukzessiven Erniedrigung der Apoptoseraten über die gefällten Fraktionen hinweg.

**A****B**

**Abbildung 8 Die STS-Resistenz in PMN nach Trauma wird von mehreren Serumfaktoren vermittelt.**

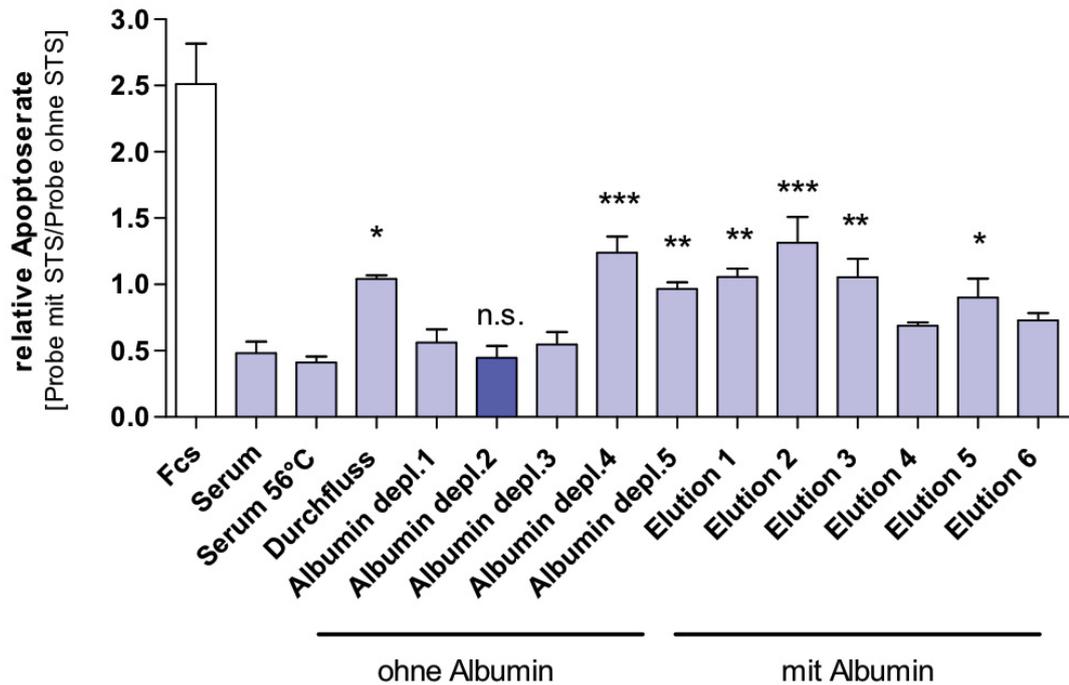
Zur Fraktionierung der Serumproteine eines repräsentativen Serumpools (Tag 1-3) entsprechend ihrer Löslichkeit wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung prozentual aufsteigend bis zu 12 Fraktionen (10-100%) durchgeführt. PMN (A) und ATRA-behandelten HL-60 Zellen (B) wurden mit den gewonnenen Proteinpellets, jeweils in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert, in An- und Abwesenheit von STS (0,2  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurde die Apoptoserate der Zellen mittels PI-Färbung und FACS-Analyse ermittelt. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS-Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , im Vergleich zu der Kontrolle (Serum). PMN: N=7, ATRA ausdifferenzierte HL-60 Zellen: N=7.

#### **4.7 Der antiapoptotische Effekt des Serums polytraumatisierter Patienten wird durch hitzestabile Albumin-unabhängige Serumfaktoren vermittelt**

Mit dem Ziel die Beteiligung von Albumin an der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma zu untersuchen, wurde ein repräsentativer Serumpool (Tag 1-3) zunächst über 20 min in einem Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert und in einem zweiten Schritt manuell Albumin depletiert (Abb. 9). Hierfür wurde die Hitrap Blue Säule, GE mittels einer 5 ml Spritze manuell mit dem Serumgemisch beladen und anschließend mit dem Bindungs- und Elutionspuffer fünf- bzw. sechsmal gespült. Die Depletion wurde manuell durchgeführt, um eine starke Dilution der gewonnen zwölf Serumfraktionen zu vermeiden. Der Probe-Durchfluss wurde bei der Beladung der Säule mit dem Serum gewonnen und bestand hauptsächlich aus Puffer. Die Fraktionen Albumin depletiert 1-5 beinhalteten alle Serumbestandteile, abgesehen von Albumin oder Albumin-bindenden Faktoren. Damit hatten die Fraktionen Elution 1-6 das Serumalbumin und Serumalbumin-abhängige Bestandteile zum Inhalt.

PMN behandelt in Anwesenheit der Fraktionen Elution 1-6 und STS wiesen eine zum Teil deutlich signifikant gesteigerte relative Apoptose im Vergleich zu der Kontrolle Serum 56°C auf. Zellen kultiviert mit den Fraktionen Albumin depletiert 1-3 zeigten eine ähnlich niedrige Apoptoserate wie die Kontrolle (Serum 56°C) auf, vor allem die Inkubation von PMN mit der Fraktion Albumin depletiert 2.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gesuchten Serumfaktoren Albumin unabhängig und in den Fraktionen Albumin depletiert 1,2 und 3 weiterhin enthalten sind. Im Rahmen der Detektion der antiapoptotisch wirkenden Serumfaktoren nach Trauma, erfolgte die Weiterverwendung der Proteinfractionen Albumin depletiert 1,2 und 3 im nachfolgenden Experiment.



**Abbildung 9 Hitzestabile, Albumin-unabhängige Serumfaktoren vermitteln den antiapoptotische Effekt des Serums polytraumatisierter Patienten in PMN**

Ein repräsentativer Serumpool (Tag 1-3) wurde zunächst bei 56°C im Wasserbad 20 min hitzeinaktiviert und anschließend manuell Albumin-depletiert mittels der Chromatographiesäule HiTRAP blue unter Generierung von 5 Fraktionen „Albumin depletiert“, 6 Fraktionen Elution (Elution 1-6) und der Probe Durchfluss. Anschließend wurden frisch isolierte PMN in Anwesenheit der gewonnenen Serumfraktionen (3%) eine Stunde vorinkubiert, um über Nacht mit 0,2 µM STS kultiviert zu werden. Nach Ablauf von 18 h erfolgte die Bestimmung der relativen Apoptoserate. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, im Vergleich zu der Kontrolle (Serum 56°C). N=4.

Die Albumin-freien Fraktionen 1-3 wurden für nachfolgende Analysen gepoolt (Albumin depletiert 1,2,3).

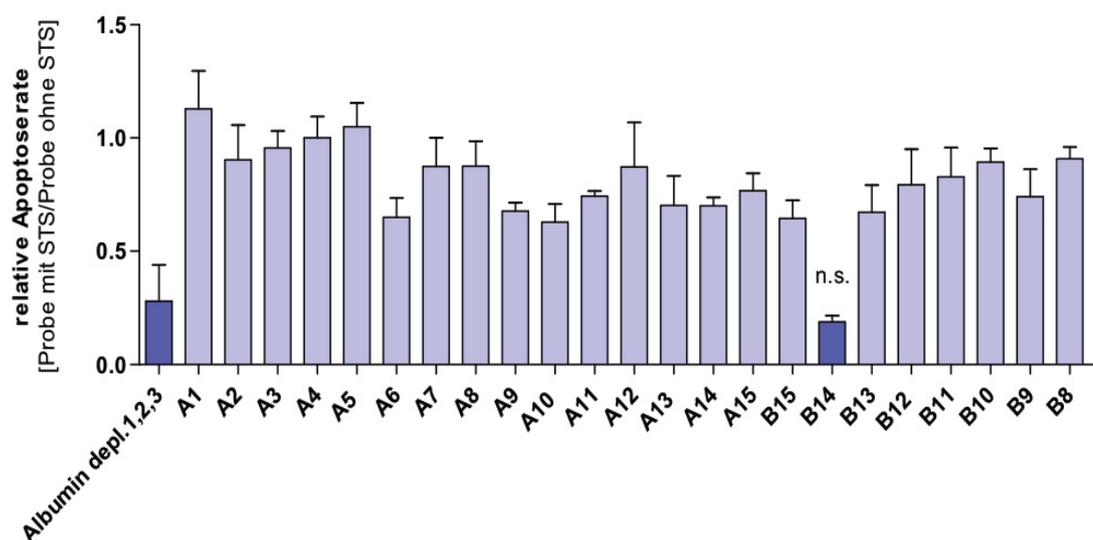
Anschließend konnte das Proteingemisch mittels Affinitätschromatographie, unter Verwendung einer Superose\_6\_10/300\_GL, GE Säule in 23 Fraktionen, der Größe nach aufgetrennt werden.

Frisch isolierte PMN von gesunden Spendern wurden in Anwesenheit von FCS (1%), Serum (1%), Albumin depletiert 1,2,3 (3%) und den neu gewonnenen Proben A1-B8 (10%) vorbehandelt und nach Ablauf einer Stunde mit STS (0,2 µM) über Nacht inkubiert. Die relative Apoptose wurde nach Ablauf von 18 h Inkubationszeit mittels der FACS-Analyse nach dem Protokoll der PJ-Färbung ermittelt.

In Abbildung 10 wird deutlich, dass PMN kultiviert in Gegenwart von den Größen-aufgetrennten Serumfraktionen A1-B8 eine signifikant höhere Apoptoserate (bis 5-

fach), als die Kontrolle Albumin depletiert 1,2,3 aufweisen. Dieses Ergebnis wurde nur von einer einzigen Fraktion, B14, nicht bestätigt. Im Vergleich zu den Nachbarfraktionen weist B14 eine deutlich erniedrigte relative Apoptose auf, ähnlich zu seiner Kontrolle Albumin depletiert 1,2,3.

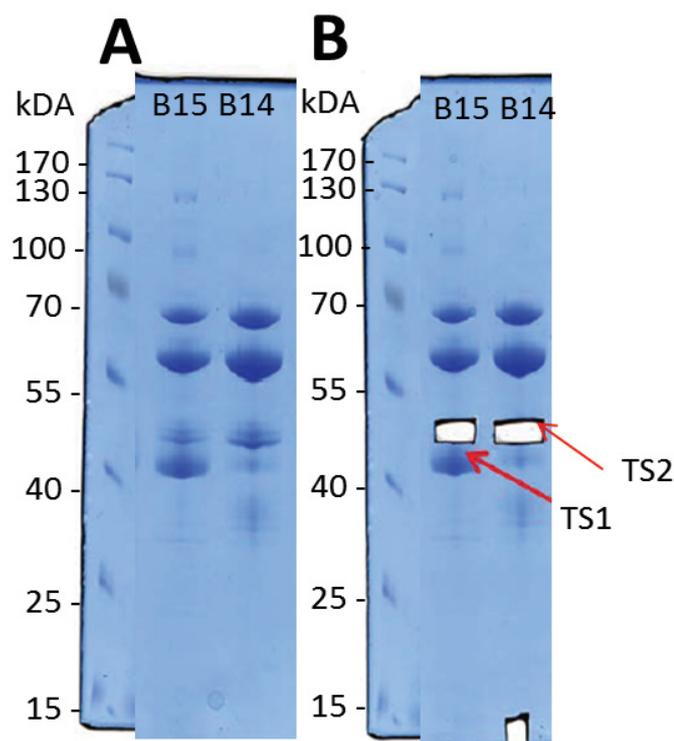
Somit gelang durch die Gewinnung der Serumfraktion B14 (Proteinkonzentration: 1,057 mg/ml) über das Verfahren der Größen-Chromatographie, die Isolation der gesuchten Serumfaktoren, die nach einem Trauma eine intrinsische Apoptoseresistenz in myeloiden Zellen vermitteln.



**Abbildung 10** Mittels dem Verfahren der Gelfiltration konnten die gesuchten antiapoptotisch wirkenden Serumfaktoren in der Fraktion B14 isoliert werden. Ein repräsentativer Patientenpool wurde zunächst bei 56°C über 20 min hitzeinaktiviert und anschließend in 12 Fraktionen über eine manuelle Albumin-Depletion aufgetrennt. 3 Albumin depletierte Fraktionen wurden zu einer gepoolt (Albumin depletiert 1, 2, 3) mit anschließender chromatographischer Auftrennung nach Größe in 23 Einheiten mittels einer Gelfiltrationssäule (Superose\_6\_10/300\_GL, GE). Anschließend wurden frisch isolierte PMN in Anwesenheit der gewonnenen Proteinfractionen A1-B8 (10%) vorinkubiert, nach einer Stunde 0,2 µM STS hinzugefügt und über Nacht kultiviert. Nach 18 h erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. n.s. = nicht signifikant, im Vergleich zu der Kontrolle (Albumin depletiert 1,2,3). N=3.

#### 4.8 Massenspektrometrische Detektion der Peptide beteiligt an der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Polytrauma

Mit dem Ziel, die beteiligten Faktoren an der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma zu untersuchen, wurden die gewonnenen Proteinfractionen B14 und B15 (je 45 µg Protein) elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (über 3 h bei 65 mA) der Größe nach aufgetrennt. Letztere diente als Negativkontrolle. Im nächsten Schritt wurden zwei Banden ausgeschnitten (Abb. 11), die anschließend mittels Massenspektrometrie auf ihre zu enthaltenden Proteine untersucht werden konnten.



**Abb.11 Auftrennung der Serumfraktionen B14 & B15 nach ihren Proteingrößen mittels SDS-Page**

Ein 12%iges Gel wurde mit den Proteinfractionen B14 und B15 beladen und über 3 h bei 65 mA Größen-aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min Coomassie gefärbt und über Nacht in der Entfärbelösung bei 4°C inkubiert. Aus dem gefärbten Gel wurden die markierten Banden aus Fraktion B14 (TS1) und B15 (TS2) entnommen und mittels dem Verfahren der Massenspektrometrie auf ihre zu enthaltenden Proteine analysiert.

Für die Massenspektrometrie wurde das Gerät Orbitrap Elite, ESI verwendet. Die Banden TS1 (B15) und TS2 (B14) wurden nach Aufbereitung (red./alk. (DTT/ IAA)) über Nacht mit Trypsin bei 37°C aufgespalten. Für die Identifizierung der Proteine wurde das Database Swissprot benutzt, mit einer MS/MS Toleranz von 0,4 kDa.

In drei Abschnitten sind in Tabelle 1 die in den Banden B15 und B14 (Abb. 10) detektierten Proteine / Peptide mit ihrer jeweiligen *Scorerate* dargestellt. Der *Cut off* wurde bei einem *Score* < 90 und unter  $2 < \Sigma\# \text{ Unique Peptiden}$  gesetzt. Der *Score* spiegelt die Summe der individuellen Peptid-Treffer wieder. Dabei werden die individuellen Peptidsequenzen eines Treffers von der Einheit  $\Sigma\# \text{ Unique Peptide}$  abgebildet.

Die in Abschnitt A aufgelisteten Proteine und Peptide wurden in beiden Serumfraktionen B15 und B14 identifiziert. In Abschnitt B wurde das Protein Alpha-1 acid Glycoprotein nur in der Fraktion B14 identifiziert. Die in Abschnitt C aufgelisteten Proteine kommen nur in Fraktion B15 vor, die als Negativkontrolle diente. Auffällig ist vor allem der größere Ig Anteil in Fraktion B15. Der humane Serumfaktor Alpha-1 acid Glycoprotein ist der einzige Faktor, der in Fraktion B14 im Gegensatz zur Kontrolle B 15 vorkommt.

**Tabelle 1 Massenspektrometrische Analyse der Serumfaktoren in B14 und B15 zur Detektion der an der intrinsischen Apoptoseresistenz nach Trauma beteiligten Faktoren.**

Für die Untersuchung der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma wurden die Faktoren in einem ausgeschnittenen Gelabschnitt aus der Fraktion B14 und B15 nach dem Verfahren der Massenspektrometrie identifiziert. Der *Cut off* wurde ab einem Proteinscore von < 90 und einer geringen Anzahl <  $2 \Sigma\# \text{ Unique Peptiden}$  gesetzt. In Abschnitt A der Tabelle sind die gemeinsamen Proteine der Fraktion B15 und B14 aufgelistet. Im Gegensatz dazu führt Abschnitt B das nur in der Fraktion B14 vorkommende Protein und C nur Serumproteine einzig der Probenfraktion B15 auf.

## A

Beschreibung	$\Sigma\#$ <i>Unique</i> Peptide	Score B14	Score B15	kDa
Vitamin D-binding protein	55	28741,7	11087,89	52,9
Ig kappa chain C	5	105,63	477,81	11,6

region				
Alpha-1-antitrypsin	49	52860,42	47778,31	46,7
Serotransferrin	49	3533,4	2805,15	77
Ig gamma-4 chain C	9	1127,64	3679,05	35,9
Ig gamma-1 chain C region	9	1629,32	5907,87	36,1
Ig gamma-2 chain C region	7	1749,04	4087,87	35,1
Alpha-2-HS- glycoprotein	17	2605,6	2372,44	39,3
Thyroxine-binding globulin	17	1220,12	1016,87	46,3
Angiotensinogen	16	2129,94	1947,43	53,1
Corticosteroid- binding globulin	11	611,08	672,61	45,1
Ig gamma-3 chain C region	4	879,98	2898,76	41,3
Alpha-2-antiplasmin	11	374,62	496,18	54,5
Ig heavy chain V-III region CAM	1	166,75	335,06	13,7
Apolipoprotein A-I	9	223,44	460,65	30,8
Ceruloplasmin	24	292,99	1111,09	122,1
Hemopexin	11	382,72	292,59	51,6
Antithrombin-III	13	694,25	651,62	52,6
Alpha-1-acid glycoprotein 2	2	200,63	103,79	23,6

## B

Beschreibung	$\Sigma$ # <i>Unique</i> Peptide	Score B14	Score B15	kDa
Alpha-1-acid glycoprotein 1	4	360,45	75,16	23,6

C

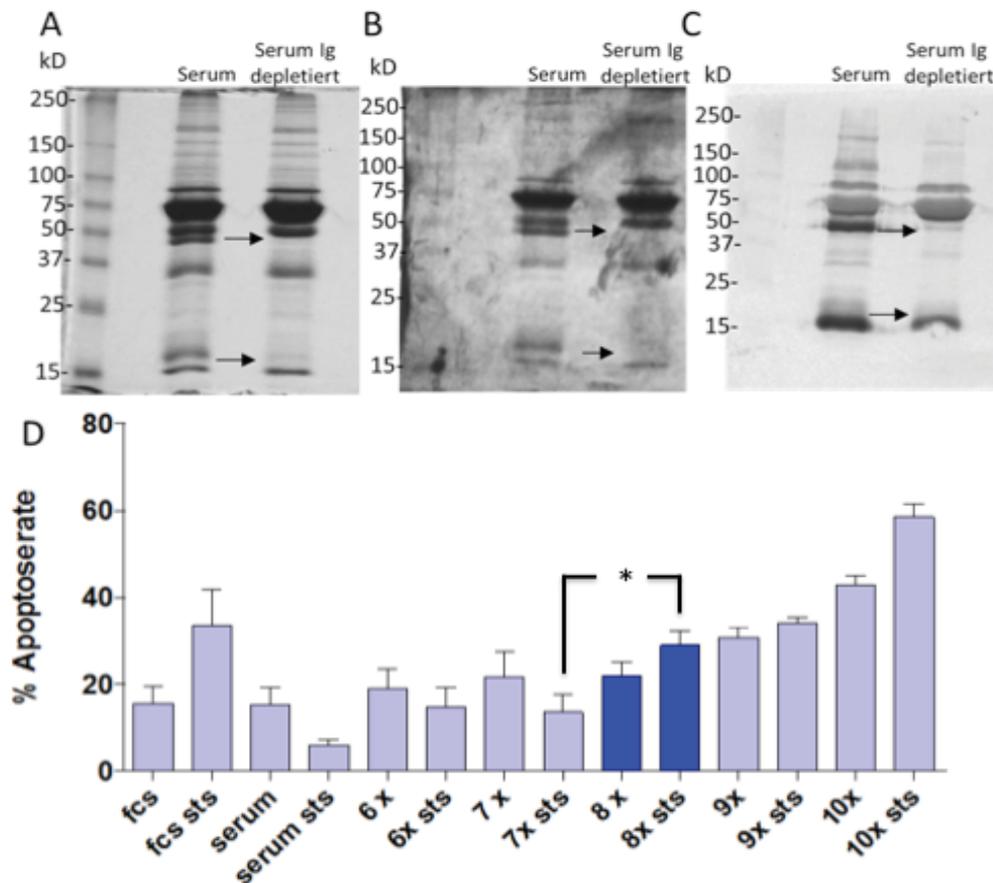
Beschreibung	$\Sigma$ # <i>Unique</i> Peptide	Score B14	Score B15	kDa
Ig lambda-2 chain C regions	4		330,05	11,3
Ig alpha-1 chain C region	5	74,83	621,4	37,6
Ig heavy chain V-III region GAL	4	49,36	263,84	12,7
Ig heavy chain V-III region BUT	2	71,15	370,6	12,4
Ig alpha-2 chain C region	2		258,99	36,5
Alpha-1-antichymotrypsin	7	31,91	245,15	47,6
Kininogen-1	6	39,69	258,86	71,9
Complement C3	2		169,29	187

## 4.9 Die gesuchten Serumfaktoren agieren Immunglobulin-abhängig

Um zu prüfen, ob Immunglobuline (Ig) die antiapoptotische Wirkung von Patienten-Serum beeinflussen, wurde ein repräsentativer Serumpool (Tag 1-3) mittels Protein G Plus/Protein A Agarose-Beads in einem zehnmals wiederholendem Zyklus Ig depletiert. Dabei wurde die Suspension in einem Verhältnis von 1:10 zu dem Serumpool gegeben und das Gemisch pro Zyklus für 1 h bei 4 °C auf einem Roller gelagert. Für die Überprüfung der vollständigen Ig-Aufreinigung des Serumpools, wurden die Bestandteile des ursprünglichen Serumpools und des Ig-depletierten Serums elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend das Gel über die Färbung nach Coomassie (Abb.12,A) und Silberfärbung (B) entwickelt. Weiterhin wurde mittels Western Blot Analyse mit anti-IgG-Antikörpern die vollständige Depletion von Ig durch Protein G/A Agarose-Beads überprüft (C).

Allgemein betrachtet besteht ein Ig aus zwei Leichtketten (jeweils 25 kDa) und zwei schweren Ketten (50 kDa). In allen drei Abschnitten in Abbildung 12 (A-C) kann man bei dem depletierten Serum jeweils eine fehlende Bande im Bereich 50 und 25kDa, im Vergleich zu Serum, erkennen. Dieses Ergebnis spricht für eine vollständige Immunpräzipitation von Ig aus dem Patienten-Serum.

Nach jedem Depletionsschritt wurden die gewonnenen Überstände an PMN ausgetestet (Abbildung 12).



**Abbildung 12 Der antiapoptotische Effekt des Patienten-Serums steht in Abhängigkeit von Immunoglobulinen**

Die Bestandteile eines Serumpools und achtfach Ig-depletierten Serums wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nachfolgend das Gel mittels Coomassie Brilliant Blue (A) und Silberfärbung (B) gefärbt. Im Weiteren wurde die Anwesenheit von Ig im Serum vor und nach Protein G/A-Beads Depletion mittels Western Blot Analyse unter Verwendung von anti-IgG Antikörpern untersucht (C).

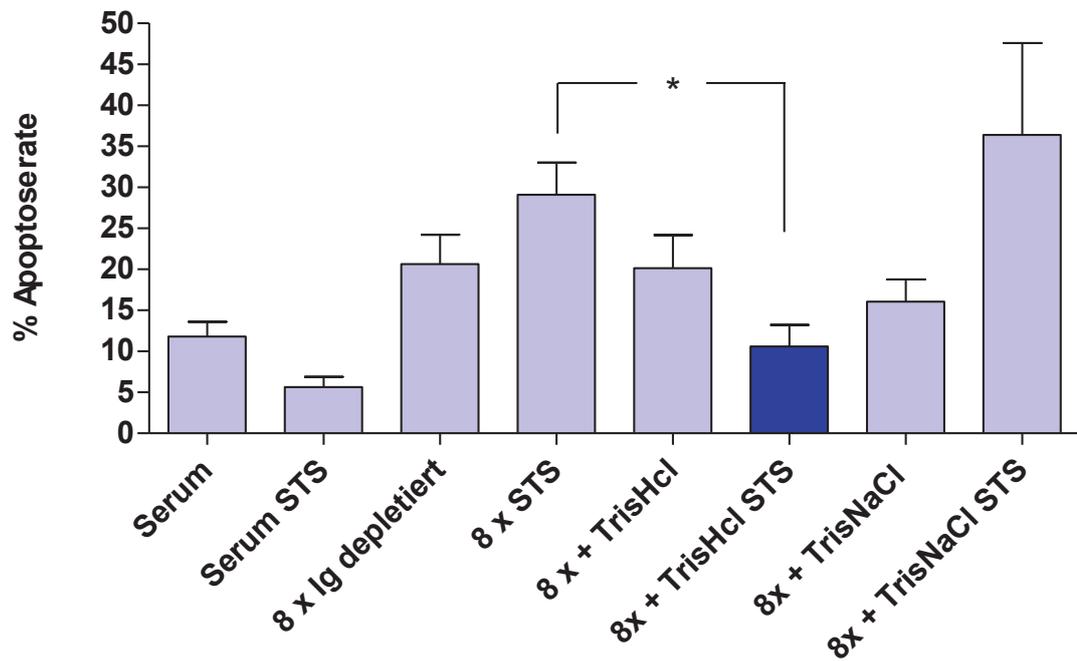
D. Ein repräsentativer Serumpool (Tag 1-3) von Patienten mit einem Polytrauma wurde, zur Analyse der Serum-vermittelten STS-Resistenz in PMN, Ig-depletiert mittels einer Protein G Plus/Protein A Agarose Suspension, in einem sich zehn Mal wiederholendem Zyklus. Zu frisch isolierten PMN wurden die gewonnenen Serumfraktionen der einzelnen Depletionszyklen 6-10 (1%), FCS (1%) und unbehandeltes Serum (1%) gegeben. Nach einer Stunde Vorbehandlung wurde 0,2  $\mu$ M STS ergänzt und die Zellen über Nacht inkubiert. Anschließend konnte die Apoptoserate mittels FACS-Analyse und PJ-Färbung ermittelt werden. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS-Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. \* $p < 0,05$ , im Vergleich zu der Kontrolle (Serum). N= 3-7

Hierfür wurden PMN von gesunden Spendern isoliert und in Anwesenheit von FCS (1%), Serum (1%) und Ig-depletiertem Serum (Zyklus 6-10) (1%) vorbehandelt. Nach einer Stunde wurde STS (0,2  $\mu$ M) hinzugegeben und die Zellen über Nacht für 18 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Bestimmung der Apoptose mittels FACS-Analyse und PJ-Färbung (Abb. 12, D). Die Kultivierung mit Ig-depletiertem

Serum führte, im Vergleich zu der Kontrolle „Serum“ in PMN, zu einer gesteigerten Apoptoserate nach STS-Behandlung ab dem Depletionsschritt 8. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass im achten Depletionsschritt die gesuchten Faktoren immunpräzipitiert wurden, bzw. ein Zusammenhang der gesuchten Serumwirkung mit Ig besteht.

In Anlehnung an die Ergebnisse aus Abbildung 12 wurden die Agarose-Beads der Serumfraktion achtmalig gewaschen und das Eluat anschließend an PMN ausgetestet. Zunächst wurden die Beads mit einem Tris-HCL Puffer (20 mM Tris, pH 7,5) und in einem nachfolgenden Schritt mit einem Tris-NaCl Puffer (2 M NaCl, 20 mM, pH 7,5) gewaschen. Von gesunden Spendern wurden PMN frisch isoliert und in Anwesenheit von FCS (1%), Serum (1%), 8 x depletiertem Serum (1%) und den Waschüberständen 8xTrisHCL und 8xTrisNaCl (1%) vorbehandelt. Nach einer Stunde wurde STS (0,2  $\mu$ M) hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert. Nach 18 h erfolgte die Bestimmung der Apoptose mittels FACS-Analyse und PJ-Färbung (Abb. 13).

Die Kultivierung von PMN in Anwesenheit von 8xTrisHCL mit STS führte zu einem vergleichweisen Abfall der Apoptoserate zu der Kontrolle 8x STS. Die Apoptoserate von 8xTrisHCL STS ist im Vergleich zur Kontrolle 8x STS signifikant vermindert. Dieses Ergebnis wiederholt sich nicht bei Inkubation von PMN mit dem zweiten Eluat 8x TrisNaCl. Hier kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate, vor allem unter STS Einwirkung. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse für eine Eluation der gesuchten Serumfaktoren in der Fraktion 8xTrisHCL von den benutzten Agarose-Beads durch den TrisHCL Puffer.

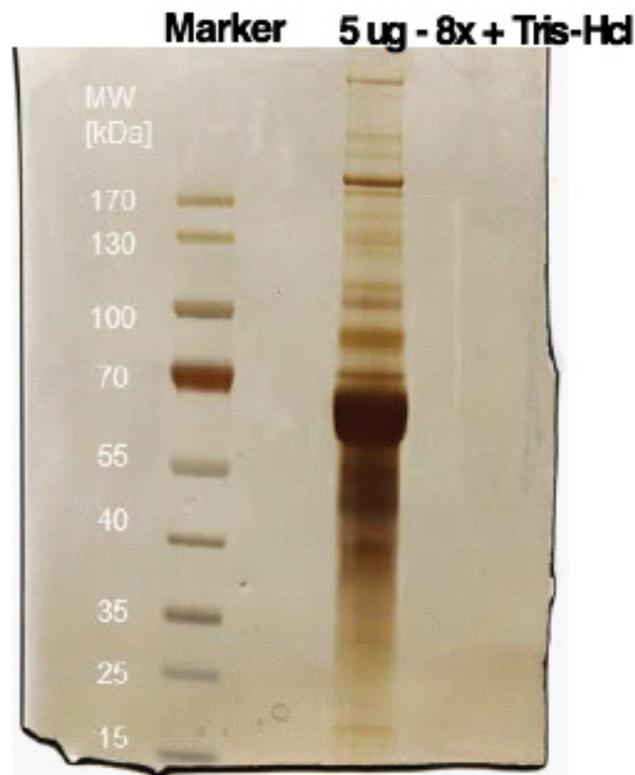


**Abbildung 13 Elution der gesuchten antiapoptotisch wirkenden Serumfaktoren durch den Puffer TrisHCL von den Agarose Beads (Zyklus 8)**

Für die Analyse der Serumfaktoren beteiligt an der STS-Resistenz in PMN nach einem Trauma wurden die Agarose-Beads der achten Depletion (Abb. 12) mittels Tris-HCL und Tris-NaCl Puffer gewaschen und das Eluat mit frisch isolierten PMN in 1 %iger Konzentration, FCS (1%), Serum (1%) und 8x depletiert (1%) inkubiert. Nach 1 h wurde 0,2  $\mu$ M STS hinzugefügt und die Apoptoserate nach 18 h mittels der FACS Analyse ermittelt. PMN inkubiert in Anwesenheit von dem Eluat 8xTrisHCL wiesen eine deutlich verminderte Apoptoserate und eine STS-Resistenz auf im Vergleich zu der Kontrolle 8x depletiert. Die Kultivierung von PMN mit dem zweiten Eluat 8xTrisNaCl führte zu einer deutlich gesteigerten Apoptoserate im Vergleich zu der Kontrolle. Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt. n.s. = nicht signifikant im Vergleich zu der Kontrolle (8x depletiert). \* =  $p < 0,05$ ; N=4.

#### 4.10 Massenspektrometrische Untersuchung der Faktoren im Eluat 8xTrisHCL zur Detektion von antiapoptotisch wirkenden Serumfaktoren

Zur Identifizierung der Hauptfaktoren, beteiligt an der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach einem Trauma, wurde die Proteinfraktion 8x Tris-HCL (5 µg Protein in Abbildung 14) elektrophoretisch mittels SDS-Page (über 3 h bei 65 mA) der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 30 min mittels Silberfärbung gefärbt und über Nacht in der Entfärberlösung bei 4°C inkubiert (Abb. 14). In einem nächsten Schritt konnte die gesammelte Bande, mittels des Verfahrens der Massenspektrometrie, auf ihre zu enthaltenden Proteine untersucht werden.



**Abbildung 14 Die Serumfraktion 8xTrisHCL wies elektrophoretisch aufgetrennt den größten Proteinanteil im 55-70 kDa Bereich auf**

Im Rahmen der Analyse der Serumfaktoren verantwortlich für die intrinsische Apoptoseresistenz nach einem Trauma in PMN wurde die Proteinfraktion 8xTrisHCL (Abb. 13) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend das Gel nach dem Verfahren der Silberfärbung gefärbt.

Für die Massenspektrometrie wurde das Gerät Orbitrap Elite, ESI verwendet. Die Bande wurde nach Aufbereitung (red./alk. (DTT/ IAA)) über Nacht mit Trypsin bei 37°C aufgespalten. Für die Identifizierung der Proteine wurde das Database Swissprot verwendet mit einer MS/MS Toleranz von 0,4 kDa.

In Tabelle 2 sind alle identifizierten Proteine / Peptide der Serumfraktion 8 xTrisHCL aufgeführt. Der *Cut off* wurde ab einem *Score* < 90 und unter  $2 < \Sigma\#$  *Unique* Peptiden gesetzt. Dabei werden die individuellen Peptidsequenzen eines Treffers von der Einheit  $\Sigma\#$  *Unique* Peptide abgebildet. Die dunkelunterlegten Zellen beinhalten die Proteine / Peptide, die bereits in der Faktoranalyse B14/B15 identifiziert wurden (Tab. 2). Dazu gehören unter anderem Serotransferrin, Alpha-1-antitrypsin, Angiotensinogen, Apolipoprotein, Alpha-2 antiplasmin, Antithrombin III, Hemopexin, Alpha-1 antichymotrypsin, Ceruloplasmin und Vitamin D binding protein.

## **Tabelle 2 Mittels Massenspektrometrie identifizierte Faktoren im Eluat 8xTrisHCL**

Für die Untersuchung der intrinsischen Apoptoseresistenz nach Trauma in PMN induziert durch Serum wurden 5 µg Protein aus dem Eluat 8 x + TriHCL elektrophoretisch mittels SDS-Page aufgetrennt und anschließend die Bande nach dem Verfahren der Massenspektrometrie, auf ihre zu beinhaltenden Faktoren untersucht. Der *Cut off* wurde ab einem Proteinscore von < 90 und einer geringen Anzahl < 2  $\Sigma\#$  *Unique* Peptiden gesetzt. In der Tabelle sind alle identifizierten Proteine und Peptide der Serumfraktion 8xTrisHCL aufgelistet. Die gemeinsamen Proteine der Fraktion B15 / B14 (Tab. 2) mit der Fraktion 8xTrisHCL sind dunkel unterlegt.

<b>Name</b>	<b>Score</b>	<b># Unique Peptides</b>	<b>MW [kDa]</b>
<b>Serotransferrin</b>	9983,43	57	77
<b>Alpha-1-antitrypsin</b>	6794,13	38	46,7
<b>Apolipoprotein B-100</b>	6033,73	180	515,3
<b>Haptoglobin</b>	5468,34	13	45,2
<b>Alpha-2-macroglobulin</b>	4857,02	68	163,2
<b>Ceruloplasmin</b>	2512,19	42	122,1
<b>Fibronectin</b>	2444,22	56	262,5
<b>Vitamin D-binding protein</b>	2237,05	30	52,9
<b>Alpha-1-antichymotrypsin</b>	2016	26	47,6
<b>Hemopexin</b>	1654,51	28	51,6
<b>Plasma protease C1 inhibitor</b>	1647,33	21	55,1

<b>Plasminogen</b>	1563,21	37	90,5
<b>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4</b>	1253,28	31	103,3
<b>Beta-2-glycoprotein 1</b>	1200,02	19	38,3
<b>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2</b>	1185,48	26	106,4
<b>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1</b>	1088,72	19	101,3
<b>Antithrombin-III</b>	984,66	19	52,6
<b>Kininogen-1</b>	976,66	21	71,9
<b>Prothrombin</b>	867,08	21	70
<b>Vitronectin</b>	790,35	13	54,3
<b>Alpha-1-acid glycoprotein 1</b>	733,82	4	23,5
<b>von Willebrand factor</b>	719,85	23	309,1
<b>Alpha-2-HS-glycoprotein</b>	626,64	10	39,3
<b>Alpha-1B-glycoprotein</b>	573,22	13	54,2
<b>Angiotensinogen</b>	555,16	11	53,1
<b>Retinol-binding protein 4</b>	549,45	12	23
<b>Alpha-1-acid glycoprotein 2</b>	525,28	4	23,6
<b>Afamin</b>	512,99	25	69
<b>Clusterin</b>	484,79	13	52,5
<b>Gelsolin</b>	455,33	14	85,6
<b>Zinc-alpha-2-glycoprotein</b>	440,14	14	34,2
<b>Histidine-rich glycoprotein</b>	437	13	59,5
<b>Serum amyloid A-2 protein</b>	405,27	3	13,5
<b>Alpha-2-antiplasmin</b>	402,24	15	54,5
<b>Heparin cofactor 2</b>	369,46	12	57
<b>Fibrinogen gamma chain</b>	337,82	12	51,5
<b>CD5 antigen-like</b>	321,04	10	38,1
<b>Vitamin K-dependent protein S</b>	308,87	11	75,1
<b>Fibrinogen alpha chain</b>	299,35	12	94,9
<b>Plasma kallikrein</b>	289,38	13	71,3
<b>Fibrinogen beta chain</b>	281,23	9	55,9
<b>Hyaluronan-binding protein 2</b>	267,35	9	62,6
<b>Thyroxine-binding globulin</b>	265,81	9	46,3

<b>Monocyte differentiation antigen</b>			
<b>CD14</b>	239,69	6	40,1
<b>Galectin-3-binding protein</b>	237,66	8	65,3
<b>Coagulation factor XIII B chain</b>	219,52	10	75,5
<b>Insulin-like growth factor-binding protein</b>			
	212,72	8	66
<b>N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase</b>			
	208,14	9	62,2
<b>Attractin</b>	203	5	158,4
<b>C-reactive protein</b>	190,76	9	25
<b>Phosphatidylinositol-glycan phospholipase D</b>			
	177,22	5	92,3
<b>Lumican</b>	170,38	8	38,4
<b>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</b>			
	150,67	11	99,8
<b>Lactotransferrin</b>	129,23	5	78,1
<b>Fibulin-1</b>	124,67	5	77,2
<b>Kallistatin</b>	121,48	5	48,5
<b>EGF-containing extracellular matrix protein 1</b>			
	115,43	3	54,6
<b>Extracellular matrix protein 1</b>	109,65	5	60,6
<b>Carboxypeptidase N catalytic chain</b>	101,84	4	52,3
<b>Lipopolysaccharide-binding protein</b>	96,92	5	53,3
<b>Plasma serine protease inhibitor</b>	93,82	4	45,6
<b>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</b>	522,02	12	38,2

Mittels der Massenspektrometrie wurden die zu beinhaltenden Faktoren der Serumfraktion B14 und 8xTrisHCL bestimmt und in Hinblick auf immunmodulierende Faktoren miteinander verglichen (Tabelle 3). Unter Ausschluss von Komplement, Ig und Faktoren, unabhängig von der Apoptoseregulation, ergaben sich 18 Proteine, die in einem Zusammenhang mit der Serum-vermittelten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma stehen könnten. Die Reihenfolge folgt dem Konzentrationsgradienten von groß nach klein.

**Tabelle 3: Mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteine aus der Fraktion B14 und 8xTrisHCL**

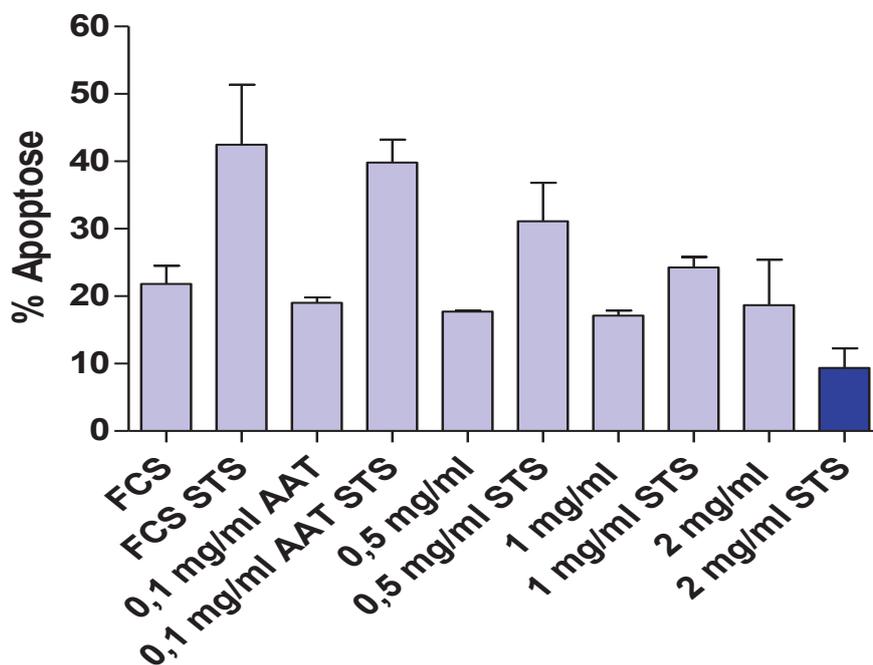
Für die Untersuchung der intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma wurden die Massenspektrometriem der Proteinfraction 8xTrisHCL und der Fraktion B14 verglichen. In der Tabelle 3 sind alle Proteine und Peptide aufgelistet, die in beiden Fraktionen identifiziert wurden, bzw. die in der Fraktion 8xTrisHCL vorkamen und in Zusammenhang mit der Apoptoseregulation stehen. Die Reihenfolge folgt dem Konzentrationsgradienten von groß nach klein. Ausgeschlossen wurden Ig, Komplementfaktoren, Proteine/Peptide < 50 kDa und Faktoren ohne Zusammenhang zur Apoptoseregulation.

Name	Pro-apoptotische Wirkung	Anti-apoptotische Wirkung	Molekulargewicht (kDa)
Serotransferrin	+	+	76-81
Alpha 1-Antitrypsin (Hochepped et al. 2003a)		+	51
Apolipoprotein B-100	+		515
Haptoglobin	+		8-200
Alpha-2-macroglobulin		+	725
Fibronectin		+	440
Vitamin D-binding protein			58
Alpha-1-antichymotrypsin (Ikari et al. 2001)	+	+	55-68
Hemopexin		+	70
Plasma protease C1 inhibitor		+	105
Plasminogen		+	90-94
Vitronectin		+	54,3
Alpha 1-acid glycoprotein (Eckersall et al.)		+	23,6
von Willebrand factor	+		309,1
Serumamyloid A-1 protein		+	13,5
Retinol-binding protein 4	+		23
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein		+	38,2
Ceruloplasmin		+	77

#### 4.11 Effekt von AAT auf die STS-Resistenz in PMN

Die mögliche Beteiligung des Serumfaktors Alpha 1-antitrypsin (AAT) an der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma galt es zu überprüfen. Dafür wurde der Effekt von aus Plasma aufgereinigtem AAT auf die STS Resistenz in PMN ausgetestet.

Frisch isolierte PMN wurden zunächst mit 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml AAT inkubiert und anschließend mit 0,2  $\mu$ M STS behandelt. Nach 18 h Inkubationsdauer wurde die Apoptoserate der PMN durchflusszytometrisch mittels PJ-Färbung bestimmt. Im Vergleich zu der Kontrolle FCS und FCS + STS fällt auf, dass in Anwesenheit von 0,1 mg/ml, 0,5mg/ml und 1mg/ml AAT die STS induzierte Apoptose schrittweise abfällt. Auf der anderen Seite führte AAT in einer Konzentration von 2 mg/ml zu einer deutlichen Minderung der STS-induzierten Apoptose im Vergleich zu der Kontrolle FCS + STS (Abb. 15).



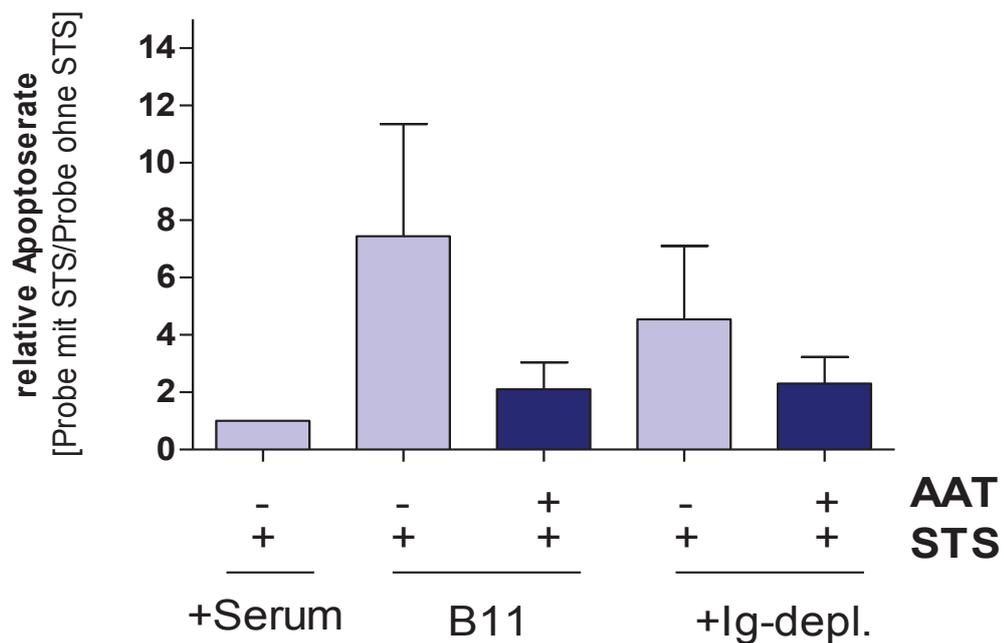
**Abbildung 15 Alpha 1-Antitrypsin induziert eine STS Resistenz in PMN**

PMN gesunder Probanden wurden in Anwesenheit von aus Plasma isoliertes Alpha-1-Antitrypsin (AAT) mit 0,2  $\mu$ M STS behandelt. Nach 18 h wurde die Apoptoserate, mittels FACS Analyse, bestimmt. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen dargestellt, die einen hypodiploiden (sub-G1) Peak aufwiesen, was der fragmentierten DNA entspricht. N=3

Um den Einfluss von AAT auf die STS Resistenz weiter zu prüfen, wurden PMN mit Patienten-Serum, der Serumfraktion B11 oder Ig-depletiertem Serum (10x Ig

depletiert) in An- bzw. Abwesenheit von AAT vorbehandelt. Nach einer Stunde wurde 0,2  $\mu$ M STS addiert.

In Abbildung 16 wird deutlich, dass Zellen, die mit der Serumfraktion B11 und mit dem Ig-depletiertem Serum inkubiert wurden, eine erhöhte Apoptoserate nach Hinzugabe von STS, im Vergleich zu der Kontrolle Serum, aufweisen. Die Zugabe von AAT führte zu einer deutlichen Abnahme der STS-induzierten Apoptose in PMN.



**Abbildung 16** Unter Einfluss von AAT sinkt die Apoptoserate von PMN inkubiert mit Serum B11 oder Ig-depletiertem Serum und STS

Für die Analyse der Serumfaktoren beteiligt an der STS-Resistenz in PMN nach einem Trauma wurde die Apoptoserate von PMN, inkubiert mit Serum von Patienten nach Trauma + STS, der Serumfraktion B11 + STS oder Ig-depletiertem Serum + STS in An- oder Abwesenheit von AAT (1,5 mg/ml), untersucht. Nach einstündiger Inkubationszeit wurde 0,2  $\mu$ M STS hinzugefügt und nach 18h Gesamtkulturzeit die Apoptoserate mittels FACS analysiert.

Es ist die Relation der Apoptoserate nach STS Behandlung zur entsprechenden Kontrolle ohne STS dargestellt, N=3.

## 5 Diskussion

Zirkulierende, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind terminal ausdifferenzierte, nicht proliferierende Zellen des angeborenen Immunsystems und essentiell als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene im Organismus. Eine Gewebeschädigung in Folge eines Traumas führt zur sofortigen Aktivierung der PMN (Hernandez et al. 1987b). Die abundanten Zellen weisen eine sehr kurze Lebensdauer von 8 – 20 h auf, bevor sie in die physiologisch konstitutive Apoptose gehen (Edwards 1994).

Die konstitutive Apoptose von PMN kann unter anderem durch zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren (Martin 1999), sowie Lipopolysacchariden (LPS) (Lee et al. 1993) aber auch durch Hypoxie (Leuenroth et al. 2000) physiologisch gemindert werden.

Durch Zytokine am Ort der Entzündung mobilisiert, bekämpfen PMN pathogene Mikroorganismen, Viren und Protozoen mittels Phagozytose, oxidativen *Burst*, Degranulation und über die Freisetzung von extrazellulären Chromatin-Protein Fallen (NET, *neutrophil extracellular trap*) (Brinkmann et al. 2004). Eine weitere Funktion der PMN ist die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Fc-Rezeptoren, Chemokine und Zytokine und antiinflammatorischer Faktoren, wie z.B. IL-10 oder TGF- $\beta$ , zur Resolution der Inflammation und Interaktion (Cowburn et al. 2008). PMN stellen ein Schlüsselement in der Aktivierung, Regulation und Effektorfunktion der Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems dar. Jedoch sind die posttraumatischen Reaktionsmechanismen der PMN unspezifisch und das vermehrte zytotoxische Potential durch verstärkte Bildung von ROS kann zur Schädigung von Gewebe führen (Duffin et al. 2010). Somit ist ein Gleichgewicht zwischen dem Überleben und dem physiologischen Zelltod der PMN grundlegend für die Kontrolle der Funktionalität der potentiell toxischen Zellen. Einerseits ist die kurze Lebensdauer der PMN für die Zellhomöostase und Terminierung der Entzündung essentiell, auf der anderen Seite ermöglicht eine Verlängerung der Lebensdauer die Bekämpfung von pathogenen Erregern (Savill und Haslett 1995).

In Folge eines schweren Traumas ist die Entwicklung eines Sepsis-bedingten Multiorganversagens der häufigste Todesgrund (Biffl et al. 1999). Im Entstehungsmechanismus der Sepsis nehmen die PMN eine zentrale Stellung ein. Mehrere Arbeiten belegen, dass die Apoptose in PMN bei Patienten mit Risiko für ein Organversagen (SIRS oder Sepsis) deutlich reduziert ist (Paunel-Gorgulu et al. 2009). Eine Dysregulation der PMN-Apoptose ist mit der Pathogenese mehrerer Krankheiten, wie z.B. Krebs, chronischen Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen assoziiert (Mantovani et al. 2011). Entsprechend steht die Regulation der PMN Apoptose im Fokus aktueller Forschung.

Die nach einem Trauma verzögerte spontane Apoptose in Zellen der hämatopoetischen Linie wird über noch teilweise unbekannt Serumfaktoren induziert und geht mit einer intrinsischen Apoptoseresistenz einher. Die Kultivierung frisch isolierter PMN von gesunden Spendern mit Serum polytraumatisierter Patienten führt zu einer reduzierten spontanen Apoptoserate und Staurosporin (STS)-Resistenz, einem Induktor, der intrinsischen Apoptose (Paunel-Gorgulu et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich dieses Ergebnis in Zellen der lymphatischen Zellreihe reproduzieren und ist somit nicht auf die myeloide Linie beschränkt.

Die Serumfaktoren, die eine Verzögerung der Apoptose in PMN bewirken, sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht worden. In der Literatur werden Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF, G-CSF und proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18, TNF-alpha und IL-6, u.a. verantwortlich gemacht, unter pathologischen Bedingungen eine signifikante Verlängerung der PMN Lebensdauer zu induzieren. Die Konzentrationen proinflammatorischer Faktoren sind im Serum polytraumatisierter Patienten deutlich erhöht (Oberholzer et al. 2001).

Im Fokus dieser Arbeit stand die Identifizierung von Serumfaktoren, die eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach einem schweren Trauma vermitteln.

Die bisherigen Ergebnisse konnten nachweisen, dass die proapoptotische Aktivität von STS in Anwesenheit von Patientenserum gehemmt wird. Auch wurde bereits in einer früheren Arbeit gezeigt, dass GM-CSF in der Serum-induzierten intrinsischen Apoptoseresistenz involviert zu sein scheint (Paunel-Gorgulu et al. 2009). So führte die Inaktivierung von GM-CSF im Serum polytraumatisierter Patienten zu einer leichten Aufhebung der STS Resistenz in PMN.

GM-CSF wurde bereits in den 80er Jahren als ein wichtiger Regulator der Hämatopoese mit vielfältigen Wirkungen auf die Differenzierung und Proliferation innerhalb der myeloiden Zelllinie entdeckt (Gasson et al. 1984). GM-CSF hat einen Lebenszeit-verlängernden Effekt auf PMN und steht mit einer erhöhten Lebensspanne von PMN unter Inflammation in Verbindung (Matute-Bello et al. 2000). Der Faktor wird als pro-inflammatorisches Zytokin für die gehemmte spontane Apoptose in PMN unter den Bedingungen einer SIRS verantwortlich gemacht, *in vitro* (Goodman et al. 1999). Andererseits konnte in einer Untersuchung von Masayasu Iwase et al. 2005 eine dominante Rolle proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. GM-CSF, IL-6 und IL-8 als alleinige Induktoren der antiapoptotischen Aktivität des Serums unter Inflammation in PMN ausgeschlossen werden (Iwase et al. 2006).

Um die früheren Ergebnisse der Arbeitsgruppe zu prüfen, wurde der Einfluss von rekombinanten GM-CSF auf die STS-Resistenz getestet. PMN inkubiert in Anwesenheit von rekombinatem GM-CSF wiesen eine reduzierte spontane Apoptoserate auf. Gleichzeitig wurde über rekombinantes GM-CSF aber keine Induktion einer STS-Resistenz beobachtet. Jedoch wurde in, mit Patienten-Serum vorbehandelten PMN, eine signifikante Verminderung der STS-Resistenz in Anwesenheit von neutralisierenden GM-CSF Antikörpern beobachtet. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse auf eine Beteiligung von GM-CSF an der STS-Resistenz in PMN nach Trauma schließen, jedoch diesen Faktor nicht als alleinigen Induktor identifizieren. GM-CSF hält die Rolle eines Kofaktors in der molekularen Kaskade der antiapoptotischen Aktivität nach Polytrauma in PMN inne und hemmt generell die spontane Apoptose in PMN. Der genaue Wirkmechanismus von GM-CSF auf die intrinsische PMN-Apoptose bleibt jedoch unklar.

Mit dem Ziel der Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde in dieser Arbeit gepooltes Patientenserum hitzeinaktiviert. Über diese Methode wird sichergestellt, dass die kultivierten Zellen nicht durch Antikörperbindung lysiert werden. Es wurde bereits 1980/81 von der Arbeitsgruppe Linscott, W.D. und Triglia, R.P. nachgewiesen, dass eine Behandlung von Serum über 20-30 min bei 56 °C das Komplementsystem inhibiert (Linscott und Triglia 1981). Fraglich bleibt, ob es überhaupt möglich ist eine vollständige Inaktivierung von Komplementfaktoren über

die Hitzeinaktivierung zu erwirken. Eine Teilinaktivierung wäre auch denkbar {Moore et. al 1997}.

Bei der Hitzeinaktivierung werden Enzyme, wie die Laktatdehydrogenase (LDH) oder alkaline Phosphatase zerstört (Giard 1987). Hinzu kommt ein Verlust weiterer Komponenten, z.B. Vitamine und Wachstumsfaktoren, nach Serum-Hitzeinaktivierung. (Giard 1987). Weiterhin wurde von Koets im Jahre 1952 eine Verminderung der Albumin Konzentration im Serum nach Hitzeinaktivierung beschrieben. Wahrscheinlich kommt es über denaturierte Globulin Komplexe zu einer Absorption von Albumin (KOETS 1952). Eine Hitzeinaktivierung verändert die Wirkung und Dynamik eines Serums grundlegend. Sie führte zu einer Proteinausfällung des Patientenserums, zeigte jedoch in Hinblick auf die Apoptoserate keinen Einfluss auf die posttraumatische intrinsische Apoptoseresistenz. Folglich löste die Anwesenheit von hitzeinaktiviertem Serum in PMN und mittels ATRA ausdifferenzierten HL-60 Zellen eine verminderte relative Apoptose nach STS-Behandlung aus, ähnlich zur Kontrolle Serum. Diese Beobachtung lässt auf eine Hitzestabilität der gesuchten Serumfaktoren schließen. Auf Grund der aktuellen Datenlage kann somit von einer relativen Unabhängigkeit des Komplementsystems an der STS-Resistenz nach Trauma ausgegangen werden. Der Verlust von Vitaminen, unbestimmten Wachstumsfaktoren, sowie Enzymen, wie z.B. der Laktatdehydrogenase und die mögliche Denaturierung von Albumin scheint keine Gewichtung in den antiapoptotischen, Serum-vermittelten Prozessen in PMN nach Trauma zu haben (Giard 1987).

Das menschliche Serum ist ein sehr Protein-reiches Milieu und stellt nahezu ein Abbild des physiologischen menschlichen Proteoms dar. Fast alle Zellen kommunizieren über das Blutssystem durch Freisetzung von Botenstoffen miteinander (Anderson NL 2004). Serum beinhaltet 60-80 mg Protein/ml und zusätzlich verschiedene Moleküle, wie Salze, Lipide, Elektrolyte und kleine Metabolite (Peptide und Aminosäuren) (Chan KC und KH 2004). Den größten Anteil dieser Proteinviefalt im Serum nimmt Albumin mit 50-55% ein (Anderson NL und Anderson NG 2002). Neben Albumin machen nur wenig weitere Proteine (Ig, Transferrin, Haptoglobin und Lipoproteine) 90% des Gesamtproteinanteils im menschlichen Serum aus. Die verbliebenden 10% sind von 12 verschiedenen Proteinen dominiert und in der Tat nur 1% des gesamten Serumproteins besteht aus

Proteinen niedriger Abundanz (*low-abundance proteins*), die hier von Interesse sind (Tirumalai RS 2003). Der Analyseprozess von Serumproteinen ist kompliziert durch, vor allem die Komplexität und dynamische Breite (Isoelektrischer Punkt, Masse, Hydrophobizität) der vielen verschiedenen Proteine (Veenstra TD 2005). Ein erster Schritt in der Analyse der Serumbestandteile ist eine Reduktion der Probenkomplexität durch Depletion der Hauptproteine (Albumin, Ig). Das Verfahren der Affinitätschromatographie (anti-HSA) zur Entfernung und Isolation von Albumin stellt hierfür eine anerkannte Methodik dar und dient u.a. der Eruiierung von Albumin-gebundenen Proteinen (Albuminomen) (van Gundry RL 2007).

Humanes Albumin (66 kDa) besitzt zwei starke Bindungsstellen (Gosling 1995) und ist ein wichtiges Transportprotein für verschiedene Serumkomponenten (Hormone, Lipide, Aminosäuren, Zytokine). Die Beteiligung an pharmakologischen Interaktionen, macht Albumin zu einem sehr wichtigen Interaktionspartner im humanen Serum (Peters TJ 1996). Mittels Affinitätschromatographie ist die Wahrscheinlichkeit der Depletion von spezifischen *low-abundance* Albuminomen aus der zu charakterisierenden Serumprobe sehr hoch (Granger et al. 2005)

Tatsächlich führte hier die Depletion von Albumin und Albuminomen aus dem Serum von Polytraumapatienten zu keinem Einfluss auf die STS Apoptoseresistenz der Zellen.

In der Literatur wird von Zuo-Bing Chen et al. ein protektiver Effekt von Albumin auf Lungenzellen nach Trauma über die Herunterregulierung von CD11b/CD18 und ICAM-1 Expression auf PMN beschrieben (Chen et al. 2006). Die genannten Oberflächenfaktoren sind essentiell für die PMN Adhäsion an Endothelzellen und eine Herunterregulation ist mit einer Abnahme der Diapedese assoziiert (Dudman et al. 1999). Weiterhin spielt Albumin eine wichtige Rolle in der Feinregulation von PMN Funktionen unter inflammatorischen Bedingungen. In Zusammenschau weisen die Ergebnisse jedoch auf eine Albumin-Unabhängigkeit der gesuchten Serumfaktoren hin, die eine intrinsische Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma induzieren. Weder in der Literatur, noch *in vitro* konnte eine Albumin-assoziierte Apoptose-regulatorische Aktivität festgestellt werden.

Nach Albumin sind Immunglobuline (Ig) die zweitgrößte Fraktion innerhalb des Serums (Turner und Hulme 1970). Der Ausschluss von Ig aus dem Serum mittels

Immunpräzipitation nach achtmaliger Ig-Depletion ergab die Aufhebung der STS-Resistenz.

Ig-assoziierte Faktoren konnten durch Waschen mit einem Tris-HCL Puffers von den Beads gelöst werden. Die Kultivierung von PMN gesunder Probanden in Anwesenheit des Tris-HCL Eluats induzierte eine STS-Resistenz in den Zellen.

Die elektrophoretische Bestimmung des Proteinumfangs im Eluat 8xTrisHCL, zeigte den größten Proteinanteil der Probe im 55-70 kDa Bereich, am wahrscheinlichsten handelt es sich dabei um Albumin. Weiterhin war eine große Bandbreite an unterschiedlich großen Bestandteilen in der Serumfraktion 8xTrisHCL erkennbar.

Offensichtlich besteht eine Interaktion zwischen den gesuchten Serumfaktoren und Ig, da die verwendete Agarose -Suspension laut Herstellerangaben keine bekannten Interaktionen mit weiteren humane Serumfaktoren aufweist. Mögliche Interaktionswege der gesuchten Faktoren mit Ig könnten in Form einer Bindung zwischen dem Antigen-spezifischen Ig-Arm und den unbekanntem Serumfaktoren sein oder das Fc-Fragment des Ig spielt eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der STS-Resistenz nach Trauma. In der Literatur wird mit dem Fc-Fragment keine antiapoptotische Aktivität in Zusammenhang mit PMN unter Inflammation assoziiert. Über Bindung des Fc-Fragments von Ig und dem Fc-Rezeptor auf PMN wird die humorale und zell-vermittelte Immunantwort vernetzt und es kommt u.a. zur Aktivierung von PMN (Akerley et al. 1991). Grundsätzlich ist die Lebenszeit von aktivierten PMN, im Vergleich zum Ruhezustand, verlängert (Droemann et al. 2000). Aktuelle Untersuchungen unter Anwendung von spezifischen Fc-Rezeptorblockern machten allerdings deutlich, dass der Fc-Rezeptor auf PMN keine intrinsische Apoptoseresistenz nach Trauma induzieren kann (unveröffentlichte Daten).

Ig ist ein wichtiger Interaktionspartner von Komplementfaktoren im Zuge der humoralen Immunantwort. In der Literatur sind in Zusammenhang mit der Apoptoseregulation und Ig keine weiteren Serumfaktoren beschrieben.

Erst nach der achten Depletion von Patienten-Serum konnte eine Aufhebung der STS-Resistenz in PMN beobachtet werden. Jedoch wurde auch in den 7 Depletionszyklen zuvor Ig aus der Serumfraktion präzipitiert. Schlussfolgernd kann von einem quantitativen Zusammenhang zwischen der STS-Resistenz und Ig bzw. den gesuchten Serumfaktoren ausgegangen werden. Die Annahme der Beteiligung mehrerer Faktoren an der STS-Resistenz wurde bereits nach Ammoniumsulfat

Fällung von Patienten-Serum auf 10 Fraktionen gestellt. Gesunde PMN inkubiert mit den gefällten Fraktionen zeigten keinen signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Es fand eine sukzessive Verteilung der intrinsischen Apoptoseresistenz über die Fraktionen hinweg statt und konsekutiv ist die Beteiligung mehrere Serumfaktoren wahrscheinlich.

Abschließend konnte kein weiterer Zusammenhang zwischen Ig, als unspezifischer Bindungspartner und der STS-Resistenz in PMN nach Trauma festgestellt werden.

Mittels der Massenspektrometrie wurden die zu beinhaltenden Faktoren der Serumfraktion B14 und 8xTrisHCL bestimmt und in Hinblick auf immunmodulierende Faktoren miteinander verglichen. Unter Ausschluss von Komplement, Ig und Faktoren, unabhängig von der Apoptoseregulation, ergaben sich 18 Proteine, die in einem Zusammenhang mit der Serum-vermittelten intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma stehen könnten. Auffällig war der in der Probe vermehrte Anteil an Akute Phase Proteinen, wie Alpha-1-antitrypsin, Ceruloplasmin, Alpha-1 acid Glykoprotein und Alpha-1-chymotrypsin. Für viele dieser Faktoren sind modulatorische Eigenschaften auf die Apoptose beschrieben worden.

So ist z.B. Alpha-1 acid Glykoprotein (AGP), ein Akutes Phase Protein, das in Hepatozyten produziert und im Rahmen einer Entzündung, wie einem schweren Trauma, vermehrt ins Plasma sezerniert wird. Die Serumkonzentration von AGP korreliert mit der Schwere eines Entzündungsprozesses (Hochepped et al. 2003b).

AGP fördert eine antiinflammatorische Wirkung in PMN und dem Komplementsystem und verhindert PMN- und Komplement-assoziierte Gewebeschädigungen (Williams et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Theilgaard-Mönch et al. beschrieb 2005 erstmalig, dass zwei verschiedene Isoformen von AGP (> 50 kDa) in PMN produziert werden und damit die größte lokale Quelle von AGP darstellen (Theilgaard-Mönch et al. 2005). Das AGP wird im Rahmen einer PMN Aktivierung freigesetzt und besitzt eine feinregulatorische Wirkung auf die PMN (Rahman et al. 2008), wie z.B. eine verminderte Degranulation der Zellen (Rahman et al. 2008).

Im Weiteren bindet AGP mit hoher Affinität UCN-01 (7-Hydroxystaurosporin, STS), ein STS-Derivat, welches in der Krebs Therapie Verwendung findet (Sparreboom et al. 2004). Aufgrund der starken Bindung an Alpha-1 acid Glykoprotein ist u.a. das

Verteilungsvolumen und die systemische *Clearance* von UCN-01 im Menschen herabgesetzt, die Eliminationszeit verlängert und die ungebundene UCN-01 Fraktion im Serum vermindert. (Fuse et al. 2005). Diese Befunde ließen stark vermuten, dass AGP auch tatsächlich in der Serum-induzierten STS Resistenz in PMN nach Trauma involviert ist. So könnte die Bindung von STS an Serum-AGP eine Erklärung für die reduzierte Apoptose in mit Trauma-Serum behandelten PMN nach STS liefern, *in vitro* (Rahman et al. 2008). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe zeigen, dass in Anwesenheit von AGP (aus humanem Plasma aufgereinigt) die apoptotische Wirkung von STS in PMN weiterhin bestehen bleibt. Somit konnte die beschriebene hemmende Eigenschaft von AGP auf STS in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Ob AGP in unserem Zellsystem die Wirkung des STS Derivats UCN-01, wie in der Literatur beschrieben, tatsächlich hemmt, ist hier nicht weiter untersucht worden und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Protein, welches aufgrund seiner derzeit bekannten Effekte auf den apoptotischen Zelltod in den Fokus der Untersuchungen rückte, war das Akute-Phase-Protein Alpha 1-antitrypsin (AAT; 52 kDa). AAT wird in der Leber und mononuklearen Phagozyten produziert, wobei es eine zentral-limitierende Rolle im Spiel lokaler und systemischer Inflammationen inne hält (Ehlers 2014).

Als Serin Proteasen Inhibitor ist AAT vor allem klinisch in Zusammenhang mit dem genetischen Krankheitsbild Alpha 1-Antitrypsin Mangel und resultierenden Erkrankungen an Lunge und Leber bekannt. Die toxische Wirkung von PMN auf Gewebe hängt in einem hohen Maße von der Degranulation und Freisetzung der Neutrophilen Elastase (PMNE) ab. Schutz vor der PMNE im gesunden Gewebe bietet vor allem die Antiprotease AAT. Kommt es zu einem klinischen Mangel von AAT bzw. Überfunktion der PMNE in vulnerabilem Gewebe, kann ein Lungenemphysem oder Leberzirrhose resultieren (Ehlers 2014).

In der Literatur wird die Wirkung von AAT unter den Bedingungen einer Inflammation kontrovers beschrieben. 1993 postulierte Tigl et al. eine duale pro- und anti-inflammatorische Aktivität von AAT über die gleichzeitige Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 und des antiinflammatorischen IL-1 Rezeptorantagonisten (ILRa) (Tilg et al. 1993).

Andere Studien belegen die antiinflammatorische Funktion von AAT, z.B. die Inhibierung der Superoxid Produktion in PMN oder Herabsetzung der allgemeinen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in mononukleären Zellen (Nita et al. 2007).

Du Bois et al. beschrieben 1991, dass PMN PMNE nicht selbst produzieren, da sie das Gen nicht tragen, sondern PMNE im Rahmen des Reifungsprozesses im Knochenmark einlagern. Im Gegensatz dazu konnte die Genexpression und Produktion von AAT in PMN nachgewiesen werden (Du Bois et al. 1991). Wie bereits erwähnt, wird über die Sezernierung von AAT der lokale toxische Effekt der PMNE herabgesetzt und ein Gewebsschutz generiert (Du Bois et al. 1991). Zusätzlich reguliert AAT die Oberflächenmarker IL8, TNF $\alpha$  und den Fc-Rezeptor auf PMN. Zur Gewebsschutz unter Inflammation werden diese Faktoren durch AAT herabreguliert und somit die Aktivierung, Migration und Degranulation der PMN inhibiert (Bergin et al. 2014). Zusammenfassend wird in der Literatur eine breite antiinflammatorische Wirkung von AAT in PMN beschrieben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine AAT Konzentration von 2 mg/ml, was einer physiologischen Serumkonzentration entspricht, eine in *vitro* STS-Resistenz induzieren kann. Ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg von AAT in der Zellkultur machte deutlich, dass AAT die STS Wirkung konzentrationsabhängig in PMN vermindert. Dieses Ergebnis findet sich in der Literatur bestätigt. 2014 beschrieb Hurley et. al unter Wirkung von AAT eine erniedrigte Apoptoserate in PMN über Hemmung der ADAM17 Signalkaskade. Auch wurde gezeigt, dass AAT die STS-induzierte Apoptose in Lungenzellen über eine direkte Interaktion und Inhibierung der Caspase-3 hemmen kann (Zhang et al. 2007).

Die Ammoniumsulfatfällung von Patienten-Serum zeigte eine sukzessive Verteilung der antiapoptotischen Aktivität über die gefällten Fraktionen hinweg. Dieses Phänomen, interpretiert als Indiz für eine mögliche Beteiligung von mehreren Serumfaktoren an der intrinsischen Apoptoseresistenz, ließe sich auch mit der konzentrationsabhängigen Wirkung von AAT begründen.

In Serumfraktionen in denen die antiapoptotischen Faktoren depletiert wurden, wie z.B. die Albumin-depletierte und größenaufgetrennte Fraktion B11 und die Ig-depletierte Serumfraktion, erwies sich AAT als Re-Induktor der intrinsischen Apoptoseresistenz. Die Zugabe von aufgereinigtem AAT zu den benannten

Serumfraktionen bewirkte eine deutliche Minderung der Apoptoserate nach STS und somit Wiederherstellung der STS-Resistenz.

Im Umkehrschluss sollte die Immunpräzipitation von AAT aus Serum von Patienten mit Trauma zu einem Verlust der intrinsischen Apoptoseresistenz führen. In zukünftigen Arbeiten bleibt weiterhin ein etwaiger Zusammenhang von AAT und GM-CSF bzw. Ig zu untersuchen. Auch könnte die Caspase-3 Inhibition in PMN der entscheidende molekulare Mechanismus hinter der STS-Resistenz nach Trauma in PMN sein und ist Fokus in zukünftigen Forschungsvorhaben.

Klinisch ist die Konzentration von AAT entscheidend. Eine Herabregulation kann zu den genannten Langzeitschäden an Lunge und Leber führen und die Lebenserwartung des Patienten, je nach Ausprägung und Mutation, bereits schon in der Kindheit, drastisch beeinflussen (Kalsheker 2009). Grundsätzlich erfüllt AAT im Rahmen der Akute Phase Reaktion eine antiinflammatorische Funktion, jedoch bewirkt AAT in gesteigerter Konzentration auch eine antiapoptotische Wirkung in PMN mit Verlängerung der Lebensdauer. Diese Neutrophilie steht in Assoziation mit posttraumatischer SIRS und möglichem MOV, somit stellt AAT einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Es wäre denkbar über die Modulation der AAT Konzentration eine klinische Besserung der posttraumatischen SIRS zu erzielen. Im Rahmen einer solchen Therapie könnte jedoch das entstehende Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen im menschlichen Körper zu vielen unbekanntem Nebenwirkungen führen. An dieser Stelle gilt es weiter die Thematik zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt des Serums polytraumatisierter Patienten durch einen hitzestabilen, Albumin-unabhängigen Faktor vermittelt wird, der eine Größe von  $>50$  kDa aufweist und in einem Zusammenhang mit Ig steht. Schlussendlich konnte AAT als wesentlicher Mediator der intrinsischen Apoptoseresistenz in PMN nach Trauma identifiziert werden. Der genaue molekulare Mechanismus hinter der AAT-induzierten STS Resistenz in PMN wurde an dieser Stelle und in der Literatur nicht genau untersucht, ist aber Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

Akerley, W. L.; Guyre, P. M.; Davis, B. H. (1991): Neutrophil activation through high-affinity Fc gamma receptor using a monomeric antibody with unique properties. In: *Blood* 77 (3), S. 607–615.

Akgul, C.; Moulding, D. A.; Edwards, S. W. (2001): Molecular control of neutrophil apoptosis. In: *FEBS Lett* 487 (3), S. 318–322.

An, Gary; Nieman, Gary; Vodovotz, Yoram (2012): Computational and systems biology in trauma and sepsis: current state and future perspectives. In: *Int J Burns Trauma* 2 (1), S. 1–10.

Anderson NL; Anderson NG (2002): The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Hg. v. Mol Cell Proteomics*, 1:845–867.

Anderson NL, Polanski M. Pieper R. Gatlin T. Tirumalai RS Conrads TP Veenstra TD Adkins JN Pounds JG Fagan R. Lobley A. (2004): The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*, 2004 Apr;3(4):311-26. Epub 2004 Jan 12.

Bergin, David A.; Reeves, Emer P.; Hurley, Killian; Wolfe, Rebecca; Jameel, Ramia; Fitzgerald, Sean; McElvaney, Noel G. (2014): The circulating proteinase inhibitor  $\alpha$ -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. In: *Sci Transl Med* 6 (217), S. 217ra1. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007116.

Bhatia, Raj; Dent, Colin; Topley, Nicholas; Pallister, Ian (2006): Neutrophil priming for elastase release in adult blunt trauma patients. In: *J Trauma* 60 (3), S. 590–596. DOI: 10.1097/01.ta.0000205614.51885.ff.

Biffi, W. L.; Moore, E. E.; Zallen, G.; Johnson, J. L.; Gabriel, J.; Offner, P. J.; Silliman, C. C. (1999): Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. In: *Surgery* 126 (2), S. 198–202.

Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A. 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. In: *Chest* 101 (6), S. 1644–1655.

Botha, A. J.; Moore, F. A.; Moore, E. E.; Kim, F. J.; Banerjee, A.; Peterson, V. M. (1995): Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. In: *Surgery* 118 (2), S. 358–64; discussion 364–5.

Brinkmann, Volker; Reichard, Ulrike; Goosmann, Christian; Fauler, Beatrix; Uhlemann, Yvonne; Weiss, David S. et al. (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: *Science* 303 (5663), S. 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.

Brunkhorst, F. M. (2006): Epidemiologie, Okonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). In: *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41 (1), S. 43–44. DOI: 10.1055/s-2005-921227.

- Bruno, S.; Ardelt, B.; Skierski, J. S.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. (1992): Different effects of staurosporine, an inhibitor of protein kinases, on the cell cycle and chromatin structure of normal and leukemic lymphocytes. In: *Cancer Res* 52 (2), S. 470–473.
- Chan KC, Lucas DA Hise D. Schaefer CF Xiao Z. Janini GM Buetow; KH, Issaq HJ Veenstra TD Conrads TP (2004): Analysis of the human serum proteome. Hg. v. *Clin Proteomics* 1:101–225.
- Chen, Zuo-Bing; Wang, Zi-Wei; Ding, Chen-Yan; Yan, Jian-Hua; Gao, Yuan; Zhang, Yun et al. (2006): Can albumin administration relieve lung injury in trauma/hemorrhagic shock? In: *World J. Gastroenterol.* 12 (42), S. 6884–6888.
- Christopher, Matthew J.; Link, Daniel C. (2007): Regulation of neutrophil homeostasis. In: *Curr Opin Hematol* 14 (1), S. 3–8.
- Cobb, J. Perren; O'Keefe, Grant E. (2004): Injury research in the genomic era. In: *Lancet* 363 (9426), S. 2076–2083. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16460-X.
- Cowburn, Andrew S.; Condliffe, Alison M.; Farahi, Neda; Summers, Charlotte; Chilvers, Edwin R. (2008): Advances in neutrophil biology: clinical implications. In: *Chest* 134 (3), S. 606–612. DOI: 10.1378/chest.08-0422.
- Cross, Andrew; Moots, Robert J.; Edwards, Steven W. (2008): The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. In: *Blood* 111 (2), S. 878–884. DOI: 10.1182/blood-2007-05-087833.
- Daigle, I.; Simon, H. U. (2001): Critical role for caspases 3 and 8 in neutrophil but not eosinophil apoptosis. In: *Int Arch Allergy Immunol* 126 (2), S. 147–156.
- Dinarello, C. A. (2000): Proinflammatory cytokines. In: *Chest* 118 (2), S. 503–508.
- Droemann, D.; Aries, S. P.; Hansen, F.; Moellers, M.; Braun, J.; Katus, H. A.; Dalhoff, K. (2000): Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. In: *Chest* 117 (6), S. 1679–1684.
- Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. In: *Cell* 102 (1), S. 33–42.
- Du Bois, R. M.; Bernaudin, J. F.; Paakko, P.; Hubbard, R.; Takahashi, H.; Ferrans, V.; Crystal, R. G. (1991): Human neutrophils express the alpha 1-antitrypsin gene and produce alpha 1-antitrypsin. In: *Blood* 77 (12), S. 2724–2730.
- Dudman, N. P.; Temple, S. E.; Guo, X. W.; Fu, W.; Perry, M. A. (1999): Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats In vivo. In: *Circ. Res.* 84 (4), S. 409–416.
- Duffin, Rodger; Leitch, Andrew E.; Fox, Sarah; Haslett, Chris; Rossi, Adriano G. (2010): Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. In: *Immunol. Rev.* 236, S. 28–40. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00922.x.
- Eckersall, P. D.; Sainib, P. K.; McComb, C.: The acute phase response of acid soluble glycoprotein,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Volume 51, Issues 3–4, 1 June 1996, Pages 377–385).

- Edwards, S.W (Hg.) (1994): Biochemnistry and Physiology of the Neutrophil. Cambrigde University Press.
- Ehlers, Mario R. (2014): Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. In: *Biol. Chem.* 395 (10), S. 1187–1193. DOI: 10.1515/hsz-2014-0161.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicol Pathol* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Fialkow, Lea; Fochesatto Filho, Luciano; Bozzetti, Mary C.; Milani, Adriana R.; Rodrigues Filho, Edison M.; Ladniuk, Roberta M. et al. (2006): Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. In: *Crit Care* 10 (6), S. R155. DOI: 10.1186/cc5090.
- Fuse, Eiichi; Kuwabara, Takashi; Sparreboom, Alex; Sausville, Edward A.; Figg, William D. (2005): Review of UCN-01 development: a lesson in the importance of clinical pharmacology. In: *J Clin Pharmacol* 45 (4), S. 394–403. DOI: 10.1177/0091270005274549.
- Gasson, J. C.; Weisbart, R. H.; Kaufman, S. E.; Clark, S. C.; Hewick, R. M.; Wong, G. G.; Golde, D. W. (1984): Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. In: *Science* 226 (4680), S. 1339–1342.
- Giard, D. J. (1987): Routine heat inactivation of serum reduces its capacity to promote cell attachment. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23 (10), S. 691–697.
- Goodman, E. R.; Stricker, P.; Velavicius, M.; Fonseca, R.; Kleinstein, E.; Lavery, R. et al. (1999): Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. In: *Arch Surg* 134 (10), S. 1049–1054.
- Gosling, P. (1995): Albumin and the critically ill. *Care Critically Ill*, 1995;11:57– 61.
- Granger, J.; Siddiqui, J.; Copeland, S.; Remick, D. (2005): Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics*, 2005 Dec;5(18):4713-8.
- Gross, A.; McDonnell, J. M.; Korsmeyer, S. J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. In: *Genes Dev* 13 (15), S. 1899–1911.
- Hashimoto, F.; Horigome, T.; Kanbayashi, M.; Yoshida, K.; Sugano, H. (1983): An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. In: *Anal. Biochem.* 129 (1), S. 192–199.
- Hernandez, L. A.; Grisham, M. B.; Twohig, B.; Arfors, K. E.; Harlan, J. M.; Granger, D. N. (1987): Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. In: *Am J Physiol* 253 (3 Pt 2), S. H699-703.
- Hernandez, L. A.; Grisham, M. B.; Twohig, B.; Arfors, K. E.; Harlan, J. M.; Granger, D. N. (1987): Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. In: *Am. J. Physiol.* 253 (3 Pt 2), S. H699-703.
- Hietbrink, F.; Koenderman, L.; Rijkers, Gt; Leenen, Lph (2006): Trauma: the role of the innate immune system. In: *World J Emerg Surg* 1, S. 15. DOI: 10.1186/1749-7922-1-15.

- Hochepped, Tino; Berger, Franklin G.; Baumann, Heinz; Libert, Claude (2003): Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (1), S. 25–34.
- Hochepped, Tino; Berger, Franklin G.; Baumann, Heinz; Libert, Claude (2003):  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & Growth Factor Reviews* (1).
- Hurley, K., Lacey, N., O'Dwyer, C. A., Bergin, D. A., McElvaney, O. J., O'Brien, M. E., McElvaney, O. F., Reeves, E. P., and McElvaney, N. G. (2014) Alpha-1 antitrypsin augmentation therapy corrects accelerated neutrophil apoptosis in deficient individuals. *J Immunol* **193**, 3978-3991
- Igney, Frederik H.; Krammer, Peter H. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (4), S. 277–288. DOI: 10.1038/nrc776.
- Ikari, Y.; Mulvihill, E.; Schwartz, S. M. (2001): alpha 1-Proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. In: *J. Biol. Chem.* 276 (15), S. 11798–11803. DOI: 10.1074/jbc.M008503200.
- Iwase, Masayasu; Kondo, Gen; Watanabe, Hitoshi; Takaoka, Sayaka; Uchida, Makiko; Ohashi, Masaru; Nagumo, Masao (2006): Regulation of Fas-mediated apoptosis in neutrophils after surgery-induced acute inflammation. In: *J Surg Res* 134 (1), S. 114–123. DOI: 10.1016/j.jss.2005.10.013.
- Kalsheker, N. A. (2009): 1-Antitrypsin deficiency: best clinical practice. In: *Journal of Clinical Pathology* 62 (10), S. 865–869. DOI: 10.1136/jcp.2008.063495.
- Kawakami, Tamihiro; Ohashi, Syuichiro; Kawa, Yoko; Takahama, Hideto; Ito, Masaru; Soma, Yoshinao; Mizoguchi, Masako (2004): Elevated serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with active phase of sweet syndrome and patients with active behcet disease: implication in neutrophil apoptosis dysfunction. In: *Arch Dermatol* 140 (5), S. 570–574. DOI: 10.1001/archderm.140.5.570.
- Keel, Marius; Trentz, Otmar (2005): Pathophysiology of polytrauma. In: *Injury* 36 (6), S. 691–709. DOI: 10.1016/j.injury.2004.12.037.
- KOETS, P. (1952): The decrease of albumin concentration of human blood serum during heat inactivation. In: *Science* 115 (2975), S. 21–22.
- Kotone-Miyahara, Yasuko; Yamashita, Kouhei; Lee, Kyung-Kwon; Yonehara, Shin; Uchiyama, Takashi; Sasada, Masataka; Takahashi, Atsushi (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. In: *J. Leukoc. Biol.* 76 (5), S. 1047–1056. DOI: 10.1189/jlb.0104048.
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. In: *J. Biochem. Biophys. Methods* 10 (3-4), S. 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

- Lee, A.; Whyte, M. K.; Haslett, C. (1993): Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. In: *J. Leukoc. Biol.* 54 (4), S. 283–288.
- Leuenroth, S. J.; Grutkoski, P. S.; Ayala, A.; Simms, H. H. (2000): Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. In: *Surgery* 128 (2), S. 171–177. DOI: 10.1067/msy.2000.107609.
- Levy, Mitchell M.; Fink, Mitchell P.; Marshall, John C.; Abraham, Edward; Angus, Derek; Cook, Deborah et al. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Intensive Care Med* 29 (4), S. 530–538. DOI: 10.1007/s00134-003-1662-x.
- Linscott, W. D.; Triglia, R. P. (1981): The bovine complement system. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 137, S. 413–430.
- Logters, Tim T.; Altrichter, Jens; Paunel-Gorgulu, Adnana; Sager, Martin; Witte, Ingo; Ott, Annina et al. (2010): Extracorporeal immune therapy with immobilized agonistic anti-Fas antibodies leads to transient reduction of circulating neutrophil numbers and limits tissue damage after hemorrhagic shock/resuscitation in a porcine model. In: *J Inflamm (Lond)* 7, S. 18. DOI: 10.1186/1476-9255-7-18.
- Maianski, N. A.; Maianski, A. N.; Kuijpers, T. W.; Roos, D. (2004): Apoptosis of neutrophils. In: *Acta Haematol* 111 (1-2), S. 56–66. DOI: 10.1159/000074486.
- Mannick, J. A.; Rodrick, M. L.; Lederer, J. A. (2001): The immunologic response to injury. In: *J. Am. Coll. Surg.* 193 (3), S. 237–244.
- Mantovani, Alberto; Cassatella, Marco A.; Costantini, Claudio; Jaillon, Sébastien (2011): Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. In: *Nat. Rev. Immunol.* 11 (8), S. 519–531. DOI: 10.1038/nri3024.
- Martin, T. R. (1999): Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. In: *Chest* 116 (1 Suppl), S. 2S-8S.
- Matsuda N, Hattori Y. (2006): Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy.: *J Pharmacol Sci.* 2006 Jul; 101(3):189-98. Epub 2006 Jul 6.
- Matute-Bello, G.; Liles, W. C.; Radella, F. 2nd; Steinberg, K. P.; Ruzinski, J. T.; Hudson, L. D.; Martin, T. R. (2000): Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. In: *Crit Care Med* 28 (1), S. 1–7.
- Nita, Izabela M.; Serapinas, Danielius; Janciauskiene, Sabina M. (2007): alpha1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (6), S. 1165–1176. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.02.017.
- Novotny, Alexander R.; Reim, Daniel; Assfalg, Volker; Altmayr, Felicitas; Friess, Helmut M.; Emmanuel, Klaus; Holzmann, Bernhard (2012): Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. In: *Immunobiology* 217 (6), S. 616–621. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.10.019.

- Oberholzer, A.; Steckholzer, U.; Kurimoto, M.; Trentz, O.; Ertel, W. (2001): Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients. In: *Shock* 16 (6), S. 411–414.
- Partrick, D. A.; Moore, F. A.; Moore, E. E.; Barnett, C. C., JR; Silliman, C. C. (1996): Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. In: *New Horiz* 4 (2), S. 194–210.
- Paunel-Gorgulu, Adnana; Kirichevska, Tamara; Logters, Tim; Windolf, Joachim; Flohe, Sascha (2012): Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. In: *Mol Med* 18, S. 325–335. DOI: 10.2119/molmed.2011.00380.
- Paunel-Gorgulu, Adnana; Zornig, Martin; Logters, Tim; Altrichter, Jens; Rabenhorst, Uta; Cinatl, Jindrich 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. In: *J Immunol* 183 (10), S. 6198–6206. DOI: 10.4049/jimmunol.0901264.
- Peters TJ (1996): Ligand binding by albumin All About Albumin. Biochemistry, Genetics And Medical Applications.
- Probst, Christian; Pape, Hans-Christoph; Hildebrand, Frank; Regel, Gerd; Mahlke, Lutz; Giannoudis, Peter et al. (2009): 30 years of polytrauma care: An analysis of the change in strategies and results of 4849 cases treated at a single institution. In: *Injury* 40 (1), S. 77–83. DOI: 10.1016/j.injury.2008.10.004.
- Rahman, Mizanur M. D.; Miranda-Ribera, Alba; Lecchi, Cristina; Bronzo, Valerio; Sartorelli, Paola; Franciosi, Federica; Ceciliani, Fabrizio (2008): Alpha(1)-acid glycoprotein is contained in bovine neutrophil granules and released after activation. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125 (1-2), S. 71–81. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.05.010.
- Santos-Beneit, A. M.; Mollinedo, F. (2000): Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. In: *J Leukoc Biol* 67 (5), S. 712–724.
- Savill, J. (1997): Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Hg. v. British Medical Bulletin.
- Savill, J.; Haslett, C. (1995): Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. In: *Semin. Cell Biol.* 6 (6), S. 385–393.
- Schägger, H.; Jagow, G. von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Anal. Biochem.* 166 (2), S. 368–379.
- Simon, Hans-Uwe (2003): Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. In: *Immunol Rev* 193, S. 101–110.
- Smith, J. A. (1994): Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. In: *J Leukoc Biol* 56 (6), S. 672–686.
- Sparreboom, Alex; Chen, Huachen; Acharya, Milin R.; Senderowicz, Adrian M.; Messmann, Richard A.; Kuwabara, Takashi et al. (2004): Effects of alpha1-acid glycoprotein on the clinical pharmacokinetics of 7-hydroxystaurosporine. In: *Clin. Cancer Res.* 10 (20), S. 6840–6846. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0805.

Theilgaard-Mönch, Kim; Jacobsen, Lars C.; Rasmussen, Thomas; Niemann, Carsten U.; Udby, Lene; Borup, Rehannah et al. (2005): Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. In: *J. Leukoc. Biol.* 78 (2), S. 462–470. DOI: 10.1189/jlb.0105042.

Tilg, H.; Vannier, E.; Vachino, G.; Dinarello, C. A.; Mier, J. W. (1993): Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. In: *J. Exp. Med.* 178 (5), S. 1629–1636.

Tirumalai RS, Chan KC Prieto DRA Issaq HJ Conrads TP Veenstra TD (2003): Characterization of the low molecular weight human serum proteome. Hg. v. *Mol Cell Proteomics* 2:1096–1103 (*Mol Cell Proteomics* 2:1096–1103).

Tscherne, H.; Regel, G.; Sturm, J. A.; Friedl, H. P. (1987): Schweregrad und Prioritäten bei Mehrfachverletzungen. In: *Chirurg* 58 (10), S. 631–640.

Turner, M. W.; Hulme, B. (1970): *The Plasma Proteins: An Introduction.*

Urh, Marjeta; Simpson, Dan; Zhao, Kate (2009): Affinity chromatography: general methods. In: *Meth. Enzymol.* 463, S. 417–438. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63026-3.

van Gundry RL, Fu Q. Jelinek CA Eyk JE Cotter RJ (2007): Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome.

Veenstra TD, Conrads TP Hood BL Avellino AM Ellenbogen RG Morrison RS (2005): Biomarkers: mining the biofluid proteome. Online verfügbar unter PMID: 15684407.

Wagner, C.; Pioch, M.; Meyer, C.; Iking-Konert, C.; Andrassy, K.; Hansch, G. M. (2000): Differentiation of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic infections and chronic inflammatory diseases: evidence of prolonged life span and de novo synthesis of fibronectin. In: *J Mol Med (Berl)* 78 (6), S. 337–345.

Williams, J. P.; Weiser, M. R.; Pechet, T. T.; Kobzik, L.; Moore, F. D.; Hechtman, H. B. (1997): alpha 1-Acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. In: *Am. J. Physiol.* 273 (5 Pt 1), S. G1031-5.

Wright, Helen L.; Moots, Robert J.; Bucknall, Roger C.; Edwards, Steven W. (2010): Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. In: *Rheumatology (Oxford)* 49 (9), S. 1618–1631. DOI: 10.1093/rheumatology/keq045.

Xiao, Wenzhong; Mindrinos, Michael N.; Seok, Junhee; Cuschieri, Joseph; Cuenca, Alex G.; Gao, Hong et al. (2011): A genomic storm in critically injured humans. In: *J Exp Med* 208 (13), S. 2581–2590. DOI: 10.1084/jem.20111354.

Zhang, Bin; Lu, Yuanqing; Campbell-Thompson, Martha; Spencer, Terry; Wasserfall, Clive; Atkinson, Mark; Song, Sihong (2007): Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. In: *Diabetes* 56 (5), S. 1316–1323. DOI: 10.2337/db06-1273.

## 7 Anhang

Auszug aus dem PDF:

<http://www.dimdi.de/static/de/klassi/faq/icd-10/icd-10-gm/maticd-sirs-def-2007-1007.pdf>:

### **Was versteht man unter SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)?**

Die Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) und die Deutsche Sepsis-Gesellschaft (DSG) beschreiben SIRS bzw. dessen Organkomplikationen folgendermaßen:

Die nachfolgenden SIRS-Kriterien sind nur auf Patienten ab dem vollendeten 16. Lebensjahr ( $\geq 16$  Jahre) anwendbar!

Der Nachweis der nachfolgenden Kriterien (einschließlich derjenigen der Organkomplikationen) muss im Einzelfall unter Würdigung ggf. anderer, gleichzeitig bestehender Krankheitszustände bewertet werden.

Die jeweiligen Kriterien eines SIRS **infektiöser** Genese ohne Organkomplikation(en) (Sepsis) sowie derjenigen eines SIRS **infektiöser** Genese mit Organkomplikation(en) (schwere Sepsis) müssen maßgeblich durch die Infektion begründet sein. Dies gilt auch für die Kriterien der Organkomplikation(en) eines SIRS **infektiöser** Genese.

Voraussetzung für ein SIRS **infektiöser** Genese ist immer die Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien.

Für das Vorliegen eines SIRS **infektiöser** Genese **ohne** Organkomplikation(en) müssen folgende Faktoren erfüllt sein: {...}

Negative Blutkultur, jedoch Erfüllung aller vier der folgenden Kriterien

1. Fieber (größer oder gleich  $38,0^{\circ}$  C) oder Hypothermie (kleiner oder gleich  $36,0^{\circ}$ C) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung

2. Tachykardie mit Herzfrequenz größer oder gleich 90/min
3. Tachypnoe (Frequenz größer oder gleich 20/min) oder Hyperventilation (bestätigt durch Abnahme einer arteriellen Blutgasanalyse mit PaCO<sub>2</sub> weniger oder gleich 4,3 kPa bzw. 33 mmHg)
4. Leukozytose (größer oder gleich 12.000/mm<sup>3</sup>) oder Leukopenie (kleiner oder gleich 4.000/mm<sup>3</sup>) oder 10% oder mehr unreife Neutrophile im Differentialblutbild {...}.

## 8 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Windolf für die Bereitstellung des Themas und durchgehenden Unterstützung danken. Meine Betreuerin Frau PD Dr. Adnana Paunel-Görgülü hat mich zu jeder Zeit mit ihrem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets in neue Sphären gelenkt, Herr Dr. Christoph Peter stand mir jederzeit für konstruktive Gespräche und experimenteller Arbeit zur Verfügung.

Meinen wissenschaftlichen Kollegen im Forschungslabor am Institut der Unfall- und Handchirurgie, UKD danke ich für die immer zielführenden Diskussionen, die so manche thematische Wende in meine Dissertation brachten.

Ich danke Kristina, meiner Schwester Ria und Tobias für die grammatikalische Unterstützung.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

08.12.2016, Theresia Sarabhai

---