

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

***In-vitro*-Studie zum Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die
Apoptose humaner neutrophiler Granulozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kristin Pliska

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

„Die Natur kreiert nichts ohne Bedeutung.“

Aristoteles, 384 - 322 v. Chr.

Für meine Familie

Veröffentlichungen zu dieser Arbeit

Posterpräsentation im Rahmen des Symposiums der Medical Research School Düsseldorf am 28.04.2017: „Z.n. Polytrauma – beeinflusst Stickstoffmonoxid die neutrophile Apoptose?“

Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine generalisierte Infektion, bei welcher sich Erreger auf dem Blutweg ausbreiten und unterschiedliche humorale und zelluläre Kaskadensysteme aktivieren. Sie gilt heutzutage noch als schwerwiegend, denn etwa 50 % der Patienten versterben trotz Maximaltherapie. Ihre Entstehung wird begünstigt durch eine überschießende Produktion humoraler und zellulärer Entzündungsmediatoren mit konsekutiver überschießender Immunreaktion. Eine besondere Rolle bei der angeborenen Immunabwehr kommt den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) zu. Es ist bekannt, dass die Apoptoserate der PMN aus dem Blut von Polytrauma-Patienten stark erniedrigt und somit ihre Überlebenszeit pathologisch erhöht ist. Durch Entzündung oder Infektion kommt es außerdem zu einer Aktivierung der normalerweise inaktiv im peripheren Blut zirkulierenden PMN. Somit kann es allorts zu einer Degranulation, Phagozytose und einem *oxidative Burst* der Neutrophilen kommen. Dies wiederum führt auch zur Schädigung gesunden Gewebes. Verschiedene Inflammationsmediatoren stimulieren andererseits die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche im Rahmen von Entzündungen zusätzliches Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. Dies führt zu einer massiv erhöhten NO-Konzentration im Blut von polytraumatisierten oder septischen Patienten, welche unter Umständen einen Einfluss auf die voraktivierten PMN haben kann. In dieser Arbeit haben wir den Einfluss von NO sowie proinflammatorischer Zytokine und Lipopolysaccharid (LPS) auf die spontane sowie die durch einen Kinaseinhibitor (Staurosporin) induzierte intrinsische Apoptose der PMN untersucht. Hierzu wurden PMN aus venösem Blut gesunder Spender isoliert, mit NO sowie proinflammatorischen Zytokinen versetzt und für 18 Stunden inkubiert. Hiernach erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie (FACS). Wir konnten zeigen, dass Stickstoffmonoxid in Konzentrationen von 2,5 bis 5 μM sowohl die spontane als auch die durch Staurosporin induzierte Apoptose signifikant reduziert. Auch bei mit Interferon γ (IF γ) sowie LPS behandelten Zellen konnten wir eine signifikante Reduktion sowohl der spontanen als auch der induzierten Apoptose nachweisen. Mittels Western Blots untersuchten wir darüber hinaus die Konzentration des antiapoptotischen Proteins *myeloid-cell leukemia 1* (Mcl-1), welches jedoch trotz verringerter Apoptose abgebaut war. Wir schlussfolgerten, dass Stickstoffmonoxid einen signifikanten Einfluss auf das Apoptoseverhalten der Neutrophilen hat. Die Veränderung des Apoptoseverhaltens jedoch Mcl-1 unabhängig vermittelt wird.

Summary

Sepsis is a general infection, which has been defined by the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine Consensus Conference as the systemic response to an infection. It is still one of the leading causes of deaths in hospitalized patients and even the main cause in non-coronary intensive care units. Polymorphonuclear neutrophils are known to play an important role in the response of the innate immune system. It is known that the normally short life span of a neutrophil is extended in septic patients or patients after major trauma. In addition, elevated levels of proinflammatory cytokines lead to an activation of these cells, so that a massive migration of neutrophils with consequent phagocytosis and oxidate burst is the consequence. This can also lead to tissue injury and persistent inflammation. On the other hand, inflammatory cytokines also stimulate the inducible nitric oxide synthase, which generates significantly larger amounts of nitric oxide at 100 to 1000-fold greater quantities. Within the scope of this thesis, we investigated the influence of nitric oxide and as well the influence of proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide (LPS) on the spontaneous and the induced intrinsic apoptosis of neutrophils. Therefore, human neutrophils were isolated from healthy volunteers and incubated with nitric oxide, proinflammatory cytokines and LPS for 18 hours. For induction of apoptosis, we used a kinase inhibitor (Staurosporin). Afterwards the neutrophil apoptosis was quantified by FACScan cytometry. Our study demonstrated that nitric oxide in concentrations of 2.5 to 5 μ M significantly reduced as well the spontaneous as the induced apoptosis of the neutrophils. Also, the incubation with proinflammatory cytokines and LPS led to a significant reduction in neutrophil apoptosis. We also performed western blot analysis to examine the concentration of the antiapoptotic protein Mcl-1 in cells, which showed reduced apoptosis in the FACScan. It was shown that the expression of Mcl-1 in cells with reduced apoptosis was still reduced. We concluded that the reduction of apoptosis via nitric oxide is independent of the Mcl-1 pathway. In summary our data demonstrates that nitric oxide as well as proinflammatory cytokines and LPS affect and reduce the neutrophil apoptosis via a pathway that is independent of the expression of Mcl-1.

Abkürzungsverzeichnis

µg	_____	Mikrogramm
ACCP	_____	<i>American College of Chest Physicians</i>
Apaf-1	_____	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	_____	antigen-präsentierende Zellen (<i>antigen-presenting Cells</i>)
APS	_____	Amoniumpersulfat
ATRA	_____	All-trans-Retinolsäure
Bak	_____	Bcl-2 Antagonist/ <i>killer</i> Protein
Bax	_____	Bcl-2-assoziiertes X Protein
Bcl-2	_____	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	_____	Bcl-2 Interaktions-Protein
BSA	_____	bovines Serum Albumin
bzw.	_____	beziehungsweise
Ca ²⁺	_____	Calcium
CAD	_____	Caspase-aktivierte DNase
CARS	_____	kompensatorisches antiinflammatorisches Reaktionssyndrom (<i>compensatory antiinflammatory response syndrome</i>)
CD	_____	Unterscheidungsgruppe (<i>cluster of differentiation</i>)
cGMP	_____	cyclisches Guanosinmonophosphat
DAMP	_____	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DNA	_____	Desoxyribonukleinsäure
DNase	_____	Desoxyribonuklease
EDTA	_____	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	_____	Durchflusszytometrie (<i>fluorescent-activated cell sorting</i>)
Fcy	_____	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	_____	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G-CSF	_____	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)

GM-CSF __ Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor*)

H₂O _____ Wasser

HCL _____ Salzsäure

IL-1β _____ Interleukin-1-beta

IL-6 _____ Interleukin-6

IL-8 _____ Interleukin-8

INF _____ Interferon

iNOS _____ induzierbare NO-Synthase

KHCO₃ _____ Kaliumhydrogencarbonat

li _____ links

LPS _____ Lipopolysaccharid

MARS _____ komplexes gegenseitiges Reaktionssyndrom (*mixed antagonist response syndrome*)

Mcl-1 _____ *myeloid-cell leukemia 1*

MIF _____ *macrophage migration inhibitory factor*

min _____ Minuten

ml _____ Milliliter

mM _____ Millimol

MOF _____ Multiorganversagen (*multiple organ failure*)

NADPH _____ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NET _____ *neutrophil extracellular traps*

ng _____ Nanogramm

NK-Zellen _____ natürliche Killerzellen (*natural killer cells*)

NO _____ Stickstoffmonoxid

NOS _____ NO-Synthase

O₂ _____ Sauerstoff

P/S _____ *Penicillin/Streptomycin*

PARP _____ Poly(ADP-ribose)-Polymerase

PBS _____ Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*)

PMN _____ polymorphkernige neutrophile Granulozyten

re _____ rechts

ROS _____ *reactive oxygen species*

rpm _____ Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)

SCCM _____ *Society of Critical Care Medicine*

SDS _____ Sodium dodecylsulfate

SIRS systemisch inflammatorisches Reaktionssyndrom (*systemic inflammatory response syndrome*)

STS _____ Staurosporin

tBid _____ gespaltenes (*truncated*) Bid

TBS _____ Tris-gepufferte Salzsäure

TEMED _____ Tetramethylethylendiamin

TNF _____ Tumornekrosefaktor

TNF α _____ Tumornekrosefaktor alpha

TNFR1 _____ Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1

TRAIL _____ *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

w/o _____ *without*

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen zu dieser Arbeit	I
Zusammenfassung	II
Summary	III
1. Einleitung	1
1.1 Die posttraumatische Entstehung von Sepsis und MOF	1
1.2 polymorphkernige neutrophile Granulozyten	3
1.2.1 Die Rolle der PMN im Rahmen von Entzündungen	4
1.2.2 Die Rolle der PMN bei der Entstehung von Sepsis und MOF	7
1.3 Apoptose	7
1.3.1 Apoptose der PMN	9
1.4 Stickstoffmonoxid	10
1.4.1 Stickstoffmonoxid und Entzündung	12
1.5 Neutrophile Granulozyten und Stickstoffmonoxid	13
1.6. NO in Sepsis, Schock und Appoptose	13
2. Ziele der Arbeit	14
3. Material und Methoden	16
3.1 Geräte	16
3.2 Materialien	18
3.2.1 Verbrauchsmaterialien	18
3.2.2 Chemikalien	19
3.2.3 Lösungen und Puffer	20
3.2.4 Medien und Zusätze	22
3.2.5 Antikörper	23
3.2.6 Zellen	23
3.2.7 Software	23
3.3 Methoden	23
3.3.1 Probanden	23

3.3.2 Methoden der Zellkultur	23
Isolierung humaner PMN	23
Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen zu neutrophil-ähnlichen Zellen	25
Bestimmung der Zellzahl	25
Zellkultur	25
3.3.3 Durchflusszytometrie	26
3.3.4 Griess-Assay	26
3.3.5 Western Blot	26
Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe	27
Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
Transfer	28
Immundetektion	28
3.3.6 Chemilumineszenzdetektion	29
3.3.7 DETA-NO (Diethylenetriamine-nitric oxide)	30
3.4 Statistische Auswertung	31
4. Ergebnisse	32
4.1 DETA-NO 10 bis 100 μM zeigt keinen Einfluss auf die Apoptose	32
4.2 Staurosporin-resistente PMN	36
4.3 Der Einfluss von 2,5 bis 10 μM DETA-NO	38
4.3.1 DETA-NO 2,5 bis 5 μM senkt spontane Apoptose	38
4.3.2 DETA NO 2,5 bis 10 μM senkt STS-induzierte Apoptose	39
4.3.3 Western Blot Analyse des Mcl-1 Proteins	41
4.4 IFγ und LPS senken die neutrophile Apoptose	42
4.4.1 Ihr Einfluss auf die spontane Apoptose	42
4.4.2 Ihr Einfluss auf die STS-induzierte Apoptose	43
4.5 Der Einfluss von DETA-NO auf die Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN	44
4.6 Der Einfluss von L-NIO	46

4.7 Der Einfluss von Nitrit auf das neutrophile Apoptoseverhalten	46
4.8 HL-60 Zellen	48
4.8.1 HL-60 Zellen und H₂O₂	49
4.9 PMN und gasförmiges Stickstoffmonoxid	51
5. Diskussion	59
5.1 Abschließende kritische Reflexion der eigenen Ergebnisse	66
Literaturverzeichnis	68
Abbildungsverzeichnis	80
Danksagung	82

1. Einleitung

1.1 Die posttraumatische Entstehung von Sepsis und MOF

Weltweit handelt es sich bei einem Trauma um eine der häufigsten Todesursachen, welche noch dazu Menschen jeden Alters betrifft. Tatsächlich ist das Trauma bei Menschen bis zu einem Alter von 40 Jahren in Deutschland sogar die häufigste Todesursache überhaupt (Wick, Ekkernkamp et al. 1997). Die Patienten versterben entweder initial an den direkten Folgen des Traumas oder im Verlauf an sekundär ablaufenden Gewebeschädigungen. Diese können bis hin zum multiplen Organversagen (*multiple organ failure*, MOF) führen bzw. auch die Entstehung einer Sepsis begünstigen. Solche sekundär ablaufenden Prozesse sind meist durch eine gestörte Immunantwort bedingt (Hietbrink, Koenderman et al. 2006). Ungefähr 5 % der Patienten mit schwerem Trauma entwickeln ein MOF. Bei diesem klinischen Syndrom kommt es zu einem Versagen mehrerer Organe, welche entweder simultan oder auch nacheinander ausfallen können (Hietbrink, Koenderman et al. 2006). Die Mortalität steigt dabei auf 50-80 % (Durham, Moran et al. 2003). Die Ursachen für ein MOF sind multifaktoriell und können in endogene und exogene Ursachen unterteilt werden. Zu den endogenen zählen neben der gegebenenfalls vorhandenen genetischen Prädisposition auch der physische Gesamtzustand, in welchem sich der Patient zum Zeitpunkt des initialen Traumas befindet. Auf der anderen Seite stehen die exogenen Faktoren, zu denen zum einen das Trauma selbst, aber auch die medizinischen Interventionen, welche als Reaktion auf das Trauma durchgeführt werden und welche unter Umständen eine Verschlechterung des Immunstatus des Patienten bewirken können, zählen (Hietbrink, Koenderman et al. 2006). All diese Faktoren zusammen beeinflussen den klinischen Zustand des Patienten und bestimmen das Risiko eines Organversagens oder einer Sepsis. Doch auch die Reaktion des Immunsystems beeinflusst die Entwicklung von Sepsis oder MOF. Physiologischerweise führt eine Verletzung zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Matzinger erklärt das mit Hilfe ihres „*danger model*“ folgendermaßen: Nach einer Verletzung können sowohl von nekrotischen als auch von gesunden Zellen Alarmsignale ausgesandt werden, sogenannte *damage-associated molecular pattern (DAMP)*-Moleküle. Diese wiederum stimulieren Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting Cells, APC*) des Immunsystems, welche daraufhin zusätzlich Entzündungsmediatoren produzieren (Matzinger 2002). Die genaue Kombination der Mediatoren bestimmt die Immunantwort. Auch die Entzündungsmediatoren wiederum können eine weitere Freisetzung von *DAMP* bewirken (Bianchi 2007). Allerdings wird dadurch die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und aus der lokalen, physiologischen Immunantwort kann sich eine systemische Immunantwort (*systemic inflammatory response*, systemisches inflammatorisches Reaktionssyndrom SIRS) entwickeln (Hietbrink, Koenderman et al. 2006). Das systemische inflammatorische Reaktionssyndrom wurde 1991 von

dem *American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine* definiert. Für die klinische Diagnose eines SIRS müssen zwei der folgenden vier Parameter erfüllt sein (Tabelle 1) (Bone, Balk et al. 1992).

Tabelle 1: klinische Parameter des SIRS/der Sepsis

1	Herzfrequenz > 90/Minute
2	Atemfrequenz > 20/Minute oder Hyperventilation mit einem arteriellen pCO ₂ von < 32 mmHg
3	Körpertemperatur >38 °C oder <36 °C
4	Anzahl der Leukozyten >12000/ µl oder < 4000/ µl oder ≥ 10 % juvenile neutrophile Granulozyten

Auf der anderen Seite folgt auf eine proinflammatorische Reaktion des Immunsystems auch eine antiinflammatorische Antwort, mit dem Ziel wieder eine Homöostase herzustellen. Die Integrität des Immunsystems soll so gesichert und reparative Mechanismen induziert werden. Doch auch diese Reaktion kann in einer überschießenden Antwort des Immunsystems münden, welche entweder zu einem kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktions-Syndrom (*compensatory anti-inflammatory response, CARS*) oder einem komplexen gegenseitigen Reaktions-Syndrom (*mixed antagonist response, MARS*) führen kann (Keel and Trentz 2005). In beiden Fällen entsteht eine Paralyse des Immunsystems mit einem Defekt der angeborenen Immunantwort (Waydhas, Nast-Kolb et al. 1992). Treten zu diesem Zeitpunkt nun neue Infektionen beim Patienten auf, so ist das Immunsystem nicht in der Lage eine adäquate Reaktion zu produzieren, weshalb Patienten in dieser Phase besonders anfällig für Infektionen mit Mikroorganismen sind. Diese Infekte verlaufen häufig kompliziert und können aufgrund der inadäquaten Immunantwort leicht in einer Sepsis münden (Moore, Sauaia et al. 1996). Laut Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* (ACCP) und der *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) aus dem Jahre 1991 wird die Sepsis wiederum definiert als SIRS mit klinischem oder mikrobiologischem Nachweis einer Infektion (Bone, Balk et al. 1992). Je nach Schweregrad wird zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock unterschieden (Levy, Fink et al. 2003). Die schwere Sepsis ist auf nicht kardiologischen Intensivstationen die führende Todesursache. Jährlich sterben in Europa ca. 150.000 Patienten und über 200.000 Patienten in den USA an den Folgen einer schweren Sepsis (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001, Levy, Fink et al. 2003). Sie geht laut Definition mit einer Organdysfunktion, welche ebenso zu einem Organversagen führen kann, einher. Trotz unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass sowohl ein SIRS als auch eine Sepsis Folgen einer inadäquaten Immunreaktion sind und beide in einem *MOF* enden können.

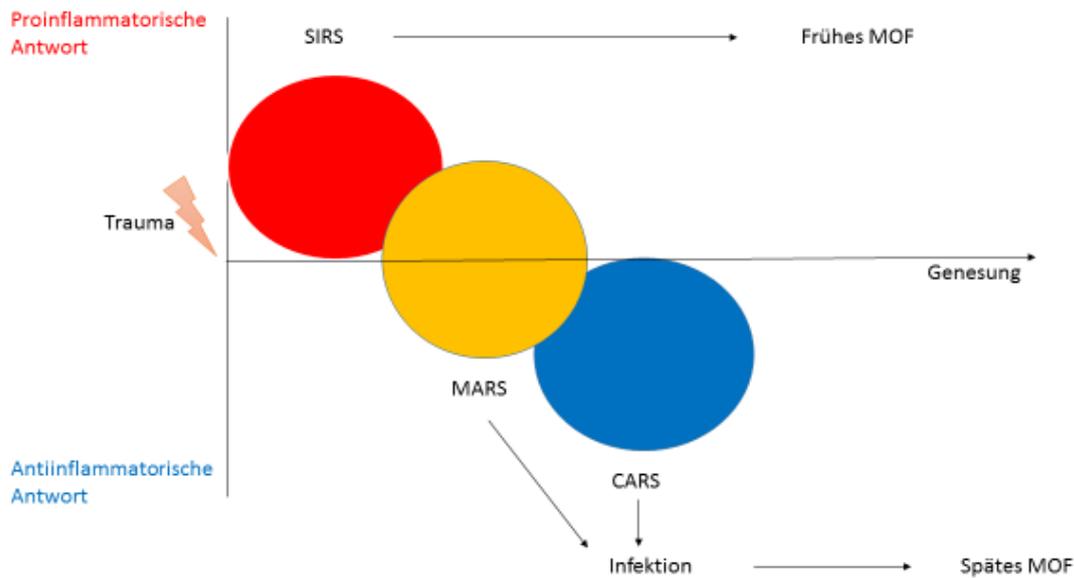


Abb. 1: biphasisches Modell des MOF modifiziert nach Moore (Moore, Sauaia et al. 1996).

Ein Trauma und die daraus resultierenden Gewebeschädigungen lösen eine Immunantwort aus. Kommt es zu einem Überschießen der proinflammatorischen Reaktion bedingt dies die Entstehung eines SIRS. Andererseits führt eine überschießende antiinflammatorische Antwort zur Entstehung eines CARS. Die resultierende Paralyse des Immunsystems bietet den Nährboden für Infektionen mit Mikroorganismen, welche sich schnell zu einer Sepsis ausweiten können.

1.2 polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind ausdifferenzierte Zellen des angeborenen Immunsystems, welche eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunreaktion spielen und darüber hinaus auch einen modulierenden Einfluss auf die Immunantwort nehmen (Nathan 2006). PMN entstehen im Knochenmark aus pluripotenten myeloiden Vorläuferzellen, welche sich vom Myeloblasten über die Zwischenstufen Promyeloblast, Promyelozyt, Myelozyt und Metamyelozyt hin zu reifen Granulozyten entwickeln (Bainton, Ulliyot et al. 1971). Täglich reifen so zwischen 10^8 und 10^{11} Zellen heran (Cannistra and Griffin 1988). Zur Differenzierung und Reifung werden hämatopoetische Wachstumsfaktoren benötigt. Die wichtigsten Mediatoren sind hierbei G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) und GM-CSF (*granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor*). Sie modulieren darüber hinaus auch die Differenzierung und Proliferation der myeloiden Stammzellen selbst, wodurch die Produktion Neutrophiler bei Bedarf um das zehnfache gesteigert werden kann (Cannistra and Griffin 1988). Der Reifungsprozess im Knochenmark dauert ungefähr sechs bis zehn Tage (Schartl 2009). Danach werden die reifen Zellen ins Blut sezerniert. Die absolute Zahl an Leukozyten im Blut liegt bei ca. 5000-10.000/ μl , wobei der Anteil der Neutrophilen mit 50 bis 65 % am höchsten ist (Heinrich 2014). Physiologischerweise ist die

Lebensdauer Neutrophiler im peripheren Blut gering; nach sechs bis zehn Stunden versterben sie durch Apoptose, welche durch Zytokine reguliert wird (Savill, Wyllie et al. 1989, Paunel-Gorgulu, Kirichevska et al. 2012). In Phasen von Infektionen oder Entzündungen kann diese Zeitspanne jedoch deutlich verlängert sein (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009, Paunel-Gorgulu, Flohe et al. 2011). Der Abbau der PMN erfolgt in der Leber durch Kupffer-Zellen, sowie im Knochenmark und in der roten Pulpa der Milz durch Makrophagen (Suratt, Young et al. 2001). Trotz ihrer kurzen Lebensphase besitzen Neutrophile umfangreiche Fähigkeiten. So können sie Enzyme und Transkriptionsfaktoren exprimieren. Liegen sie zunächst in ihrer inaktiven Form im Blut vor, so können sie dank ihrer vielzähligen membranständigen Zellrezeptoren in ihre aktivierte Form überführt werden, um dann stärker auf verschiedene anschließend dargebotene Stimuli reagieren zu können. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang zunächst die *pattern recognition* Rezeptoren, die es ermöglichen, Pathogene zu erkennen und zu binden (Hayashi, Means et al. 2003). An die Fc γ -Rezeptoren können wiederum Immunglobuline binden, was PMN-Chemotaxis und die anschließende Phagozytose mit Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert (Fossati, Moots et al. 2002). Durch Adhäsionsmoleküle, wie CD11a/CD18 oder CD11b/CD18, können PMN an Endothelzellen binden, um so aus der Blutbahn ins Gewebe zu migrieren (Pettit and Hallett 1994, Andrew JE Seely 2003). PMN enthalten in ihrem Zytoplasma mit Proteinen gefüllte Granula, welche zytotoxisch wirken. Während der Phagozytose werden deren Inhalte in Phagosomen verpackt, welche im Rahmen der Exozytose aus der Zelle ausgeschleust werden. Auch hierdurch kommt es zu einer Änderung des Phänotyps der PMN und einer Aktivierung ruhender Zellen (Faurischou and Borregaard 2003).

1.2.1 Die Rolle der PMN im Rahmen von Entzündungen

Bei Entzündungen und Infektionen kommt den PMN eine überaus wichtige Rolle zu. Nicht zuletzt machen sie mit über 90 % den weitaus größten Anteil aller zirkulierenden Phagozyten aus (Boggs 1967). Sie gelangen auch als erste Zellen zum Ort einer Entzündung (Vedder, Fouty et al. 1989). Doch ihr Verhalten scheint paradox zu sein; während sie zu Beginn der Immunantwort einen großen Einfluss auf die Höhe der Bakteriämie haben und diese kontrollieren können, so sind sie nach Ausbruch der Sepsis eher mit höherer Bakteriämie und einer größeren Organdysfunktion assoziiert (Hoesel, Neff et al. 2005). Die Funktionen der PMN im Rahmen von Entzündungen sind vielfältig. Sie können diverse proinflammatorische Zytokine produzieren, MHC-II Moleküle exprimieren und den T-Zellen Antigene präsentieren (Gosselin, Wardwell et al. 1993). Des Weiteren können sie über eine Interaktion mit dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen (*natural killer cells*, NK-Zellen) deren Aktivierung beeinflussen (Mantovani, Cassatella et al. 2011). Dadurch stellen sie als integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Verbindung zum erworbenen Immunsystem her. Neutrophile Granulozyten können in verschiedenen stabilen Zuständen vorkommen. Diese verschiedenen

Aktivitätszustände sind mit unterschiedlichen Mustern in der Expression ihrer membranständigen Zellrezeptoren assoziiert. Im Blut zirkulierend liegen die PMN zunächst in einer inaktiven Form vor. So wird eine mögliche Schädigung körpereigenen, gesunden Gewebes verhindert (Hallett and Lloyds 1995). Ein großer Teil befindet sich zu diesem Zeitpunkt als sogenannter *margination pool* in den Kapillaren bestimmter Gewebe, wie beispielsweise der Lunge (Andrew JE Seely 2003). Dieser *Pool* ermöglicht eine schnelle Mobilisierung der PMN als Reaktion auf eine Entzündung oder Infektion. Ruhende Neutrophile können durch verschiedene Stimuli in einen aktivierten Zustand überführt werden, dies mündet in ihrer Degranulation, Phagozytose und dem *oxidative burst*. Zusätzlich zu dieser Möglichkeit der Aktivierung können Neutrophile auch „geprimed“ werden. Hierbei handelt es sich um eine Art Prä-Aktivierung (Condliffe, Kitchen et al. 1998). Sie ist ein reversibler Prozess, der einen wichtigen Kontrollpunkt zwischen Immunabwehr einerseits und unkontrollierter Zerstörung gesunden Gewebes andererseits darstellt (Cowburn, Condliffe et al. 2008). *Priming* ist definiert als eine Amplifikation oder Erweiterung der Fähigkeiten Neutrophiler, welche nachfolgend als Reaktion auf einen entsprechenden Reiz zum Einsatz kommen können. Somit kann die Funktionalität und Effektivität der neutrophilen Immunantwort bei Bedarf erhöht werden (Botha, Moore et al. 1995). Das *Priming* selbst mündet folglich nicht im *oxidative burst* - außer die Konzentration des *priming agent* selbst ist bereits enorm hoch - aber es potenziert die Antwort des Neutrophilen auf einen gegebenenfalls nachfolgenden entsprechenden Stimulus (Swain, Rohn et al. 2002). Auch die Lebensphase präaktivierter Neutrophiler ist verlängert (Hallett and Lloyds 1995). Zytokine und Chemokine wie IL-8, TNF- α , INF- γ , GM-CSF oder auch bakterielle Bestandteile wie LPS können Neutrophile prä-aktivieren. Man unterscheidet das transkriptionsunabhängige vom transkriptionsabhängigen *Priming*. Bei Ersterem kann die Anzahl membranständiger Rezeptoren innerhalb kürzester Zeit signifikant erhöht werden. Dies erfolgt durch eine Mobilisation intrazellulärer Granula, welche bereits mit entsprechenden Rezeptoren gefüllt sind. Andererseits kann es durch das *Priming* auch zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommen, wodurch neue Rezeptoren synthetisiert werden (Hallett and Lloyds 1995). Die Mobilisierung der Neutrophilen erfolgt im systemischen Blutkreislauf hauptsächlich in den postkapillären Venolen bzw. im Lungenkreislauf im Bereich der Kapillaren. Aufgrund ihres Zelldurchmessers, welcher ca. 50 % des dortigen Gefäßdurchmessers beträgt, werden die Neutrophilen von schneller schwimmenden Erythrozyten an den Gefäßrand gedrückt (*Margination*) (Hogg 1987). Dort werden die PMN durch eine schwach-adhäsive Interaktion ihrer L-Selektine mit E- und P-Selektinen der Endothelzellen in der Zirkulation angehalten und rollen nun entlang des Endothels (*Rolling*). Das *Rolling* ist aufgrund währenddessen ablaufender Konformationsänderungen der oberflächlichen Integrin-Adhäsionsmoleküle der PMN sowie der Endothelzellen essentielle Voraussetzung für den nächsten Schritt in der Migration Neutrophiler: der *Adherence* (Lindbom, Xie et al. 1992). Hierbei handelt es sich um eine hochaffine Bindung der PMN mit dem Endothel (Andrew JE Seely 2003). Als nächsten Schritt passiert der Neutrophile nun

Endothel und Basalmembran. Lokale Entzündungsmediatoren erhöhen die Permeabilität des Endothels (Lenz, Franklin et al. 2007). Nach erfolgreicher Migration folgen die Neutrophilen nun im Gewebe dem chemotaktischen Gradienten hin zum Ort der Entzündung (Ryan and Hurley 1966). Dort angekommen, erkennen und opsonisieren sie mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Membranrezeptoren die Bakterien. Sie bilden Pseudopodien aus und phagozytieren die Pathogene. Die Phagosomen fusionieren anschließend mit den granulären lysosomalen Strukturen der PMN zu sogenannten Phagolysosomen, in welchen die Zerstörung der Pathogene erfolgt (Hampton, Kettle et al. 1998). Zeitgleich können PMN auch durch die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) sowie Stickstoffmonoxid zytotoxisch aktiv werden (Heinrich 2014). Anschließend sterben die PMN entweder durch spontane (Savill, Wyllie et al. 1989) oder Todesrezeptor-vermittelte (Andrew JE Seely 2003) Apoptose. Die apoptotischen PMN werden wiederum von Makrophagen phagozytiert (Savill, Wyllie et al. 1989), wodurch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 ausgeschüttet werden (Byrne and Reen 2002). Erfolgt jedoch die Phagozytose durch die Makrophagen nicht in ausreichendem Maße, so besteht die Gefahr, dass die PMN sekundär nekrotisch werden. Hierdurch gelangen in den PMN enthaltene zytotoxische Moleküle in den Interzellularraum, wo sie zu einer Schädigung des umgebenden Gewebes führen können. Der Abbau nekrotischer PMN führt wiederum zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch die abbauenden Makrophagen (Savill, Dransfield et al. 2002).

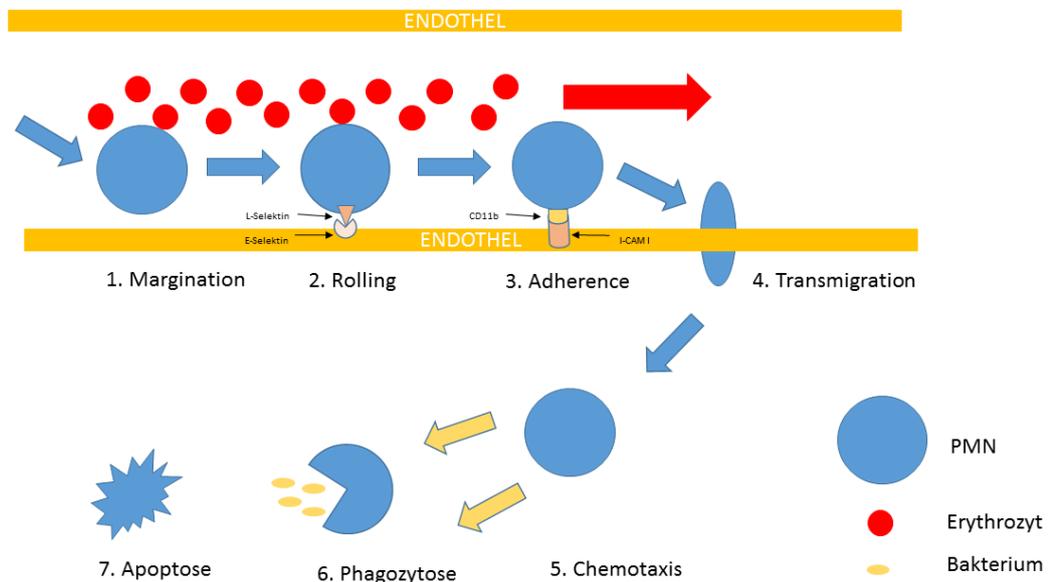


Abb. 2: Diapedese neutrophiler Granulozyten modifiziert nach Andrew JE Seely (Andrew JE Seely 2003)
 Vereinfachte Darstellung der Schritte der Diapedese neutrophiler Granulozyten. Zunächst wird der PMN an den Gefäßrand gedrückt, es kommt zur Interaktion mit der Endothelzelle, welche letztlich einen Durchtritt des PMN durch das Endothel ermöglicht. Im Gewebe folgt der Neutrophile dem chemotaktischen Gradienten, phagozytiert und zerstört Pathogene und begeht letztendlich Apoptose.

1.2.2 Die Rolle der PMN bei der Entstehung von Sepsis und MOF

Ein Gewebeschaden führt zur Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen (Hernandez, Grisham et al. 1987). Ebenso kommt es durch einen hämorrhagischen Schock mit nachfolgender Ischämie zu einer Veränderung des Gewebemetabolismus hin zu einem anaeroben Stoffwechsel. Eine darauffolgende Reoxygenierung des Gewebes führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*radical oxygen species*, ROS). Diese ROS dienen als Lockstoffe und Aktivatoren der PMN (Swain, Rohn et al. 2002). Es ist bekannt, dass Mediatoren, die während eines Entzündungsprozesses freigesetzt werden, eine antiapoptotische Wirkung auf die PMN ausüben (Savill, Dransfield et al. 2002). Darüber hinaus zeigen PMN während einer Entzündung eine größere Empfindlichkeit gegenüber antiapoptotischen Signalen (Jimenez, Watson et al. 1997). Die gleichzeitig ausgeschütteten proapoptotischen Signale haben einen geringeren Einfluss. Letztendlich kann es zu einem Überwiegen der proinflammatorischen Antwort kommen, was sowohl durch eine unkontrollierte Freisetzung zytotoxischer Granula als auch durch eine vermehrte Bildung von ROS zu einer Zerstörung gesunden Gewebes und so auch zur Entstehung eines frühen MOF führen kann. Eine unkontrollierte Migration prä-aktivierter PMN ist somit hauptverantwortlich für die Entstehung von sekundären Organ- bzw. Gewebeschäden und somit konsekutiv auch für die Entstehung einer Sepsis oder eines MOF (Botha, Moore et al. 1995, Anderson, Brown et al. 1991).

1.3 Apoptose

Die Apoptose ist essentiell für die Homöostase der Zellen. Man unterscheidet drei verschiedene Signalwege der Apoptose: den extrinsischen Signalweg (Todesrezeptor-vermittelt), den intrinsischen Signalweg (mitochondrial) sowie den Granzym/Perforin-Weg. Alle Signalwege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, welche durch die Effektor-Caspasen vermittelt wird (Elmore 2007). Am Anfang der Signalkaskade stehen ebenfalls Proteasen, die sogenannten Initiator-Caspasen, welche an der Auslösung der Apoptose beteiligt sind (Cohen 1997). Für die Regulation der Apoptose ist eine dritte Substanzklasse von Bedeutung: die Proteine der Bcl-2-Familie. Ihre Mitglieder werden in pro- (Bax, Bak, Bid) und anti-apoptotische (Bcl-2) Proteine unterteilt (Cory and Adams 2002). Die Aktivierung des extrinsischen Signalweges erfolgt durch die Bindung von Liganden an die membranständigen Todesrezeptoren (Ashkenazi and Dixit 1998). PMN exprimieren verschiedene solcher Rezeptoren, wie den CD95-Rezeptor (Fas-Rezeptor), Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) oder TRAIL-Rezeptor (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Renshaw, Parmar et al. 2003, Liles, Kiener et al. 1996). Die darauffolgende Konformationsänderung der Todesrezeptoren ermöglicht die intrazelluläre Bindung von Adaptermolekülen, welche wiederum Procaspase 8 binden. Es kommt zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase 8 (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). Diese aktiviert nun ihrerseits die

Effektor-Caspasen. Auch unabhängig von extrazellulären Signalen kann durch intrazelluläre Stresssignale wie beispielsweise DNA-Schäden, inadäquate Nähr- oder Sauerstoffversorgung oder fehlgefaltete Proteine die Apoptose ausgelöst werden. Hierbei spielen Mitochondrien die entscheidende Rolle (Elmore 2007). In Abwesenheit von Stressfaktoren wird die Integrität der Mitochondrienmembran durch ein Gleichgewicht zwischen den pro- und den anti-apoptisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Familie stabilisiert. Stress hingegen führt zu einem Überwiegen der pro-apoptischen Proteine Bax, Bak und Bid. Es entstehen sogenannte Permeabilitäts-Transitions-Poren (Marzo, Brenner et al. 1998, Saelens, Festjens et al. 2004). Die Membran depolarisiert und Apoptose-Mediatorproteine wie Cytochrom c werden aus den Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt (Kluck, Bossy-Wetzel et al. 1997). Cytochrom c wiederum bindet im Zytosol an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*). Dadurch entsteht das Apoptosom, an welches die Procaspase 9 bindet und so zur aktiven Caspase 9 wird (Chinnaiyan 1999). Diese aktiviert wiederum die Effektor-Caspasen. Zusätzlich besteht eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg. Indem die Caspase 8 das pro-apoptische Bid der Mitochondrienmembran spaltet, entsteht tBid, welches sich in die äußere Mitochondrienmembran einlagert und so den mitochondrialen Signalweg einleitet (Barnhart, Alappat et al. 2003). Die dritte Möglichkeit, eine Apoptose auszulösen, erfolgt über die Ausschüttung von Granzym und Perforin aus zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen. Das Perforin lagert sich in der Membran der Zelle ein, bildet eine Pore und ermöglicht so den Granzymen das Zytoplasma der Zelle zu erreichen (Trapani and Smyth 2002). Dort können diese sowohl Effektor-Caspase 3 aktivieren als auch über eine Aktivierung von Bid den mitochondrialen Apoptoseweg einleiten (Barry and Bleackley 2002, Alimonti, Shi et al. 2001). Jeder der drei Signalwege führt zu einer Aktivierung der Effektor-Caspasen, diese spalten einerseits Proteine des Zytoskeletts, was unter anderem zur Auflösung der Kernlamina und Freisetzung der DNA aus dem Zellkern führt (Nicholson and Thornberry 1997). Andererseits sorgen sie für eine Freisetzung der Caspase-aktivierten DNase (CAD). CAD fragmentiert nun die DNA (Enari, Sakahira et al. 1998).

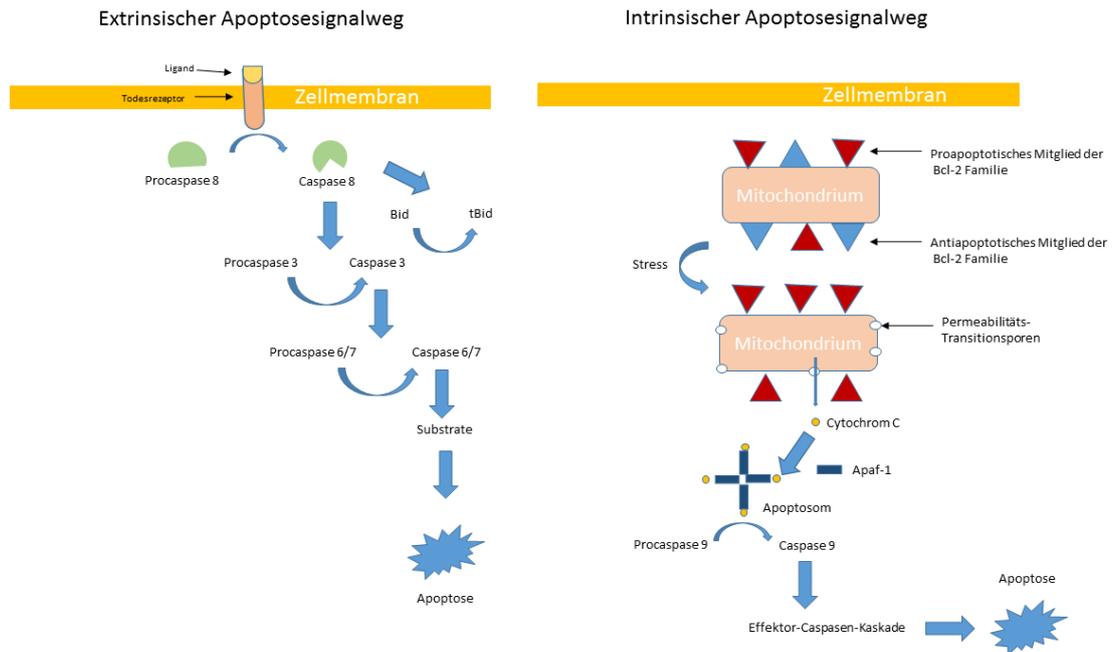


Abb. 3: extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg modifiziert nach duale Reihe Biochemie (Rassow 2016, S. 535f).

1.3.1 Apoptose der PMN

Die spontane Apoptose der Neutrophilen wird vermutlich hauptsächlich durch den intrinsischen Signalweg ausgelöst. Hierbei ist unter anderem die Abnahme der Konzentration von GM-CSF ein wichtiger Reiz (Moulding, Akgul et al. 2001). Zusätzlich wird der Einfluss einer verringerten Konzentration des antiapoptischen Proteins Mcl-1 (*myeloid-cell leukemia 1*) diskutiert (Moulding, Giles et al. 2000). Mcl-1 wird in humanen Neutrophilen konstitutiv exprimiert (Leuenroth, Grutkoski et al. 2000). Durch proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Bestandteile wie LPS kann die Expressionsrate jedoch gesteigert werden. Eine erhöhte Konzentration von Mcl-1 in den PMN steht im Zusammenhang mit einer verlängerten Lebensspanne der Zellen im Rahmen von Entzündungsreaktionen (Edwards, Derouet et al. 2004). Die durch die reduzierte Apoptose entstehende Neutrophilie soll zu einer effektiveren Immunantwort und einer Optimierung der neutrophilen Funktionalität beitragen. Bei vielen Erkrankungen konnte jedoch bereits der Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine und verringerter Apoptose der Neutrophilen erbracht werden; so zeigt sich eine verzögerte Apoptose der PMN bei Patienten mit SIRS oder Sepsis (Jimenez, Watson et al. 1997) aber auch bei ARDS (Matute-Bello, Liles et al. 1997). Andererseits geht aber auch eine vermehrte Apoptose, die in einer Neutropenie mündet, mit Komplikationen einher, so z.B. nach Chemotherapie (Crawford, Dale et al. 2004). Zusammenfassend ist eine ordnungsgemäße Regulation der neutrophilen Apoptose sowohl unter physiologischen Bedingungen zum Erhalt der

Homöostase, als auch in Phasen der Entzündung einerseits zur effektiven Immunabwehr sowie andererseits zum Abklingen der Entzündungsreaktion essentiell (Akgul, Moulding et al. 2001).

1.4 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO, Stickoxid) ist ein gasförmiges, anorganisches Molekül und ein wichtiger Mediator. Im menschlichen Organismus wurde es erst in den 1980er Jahren als Botenstoff entdeckt, welcher von Endothelzellen synthetisiert wird, um die darunterliegende glatte Gefäßmuskulatur zu relaxieren. 1998 gewannen Furchgott, Ignarro und Murad für diese Entdeckung den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Raju 2000). Heute ist bekannt: NO spielt auch darüber hinaus als universelles Signalübertragungsmolekül eine wichtige Rolle. NO entsteht in zwei NADPH-abhängigen Reaktionsschritten unter Verbrauch von zwei Sauerstoffmolekülen aus L-Arginin. NO-Synthasen (NOS) katalysieren die beiden Reaktionsschritte. Als Nebenprodukt entsteht Citrullin (Nathan 1992). NO-Synthasen sind Monooxygenasen (Joachim Rassow 2012). Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen. Die nNOS (neuronal NO-Synthase) sowie die eNOS (endotheliale NO-Synthase) sind konstitutiv exprimiert. Ihre Aktivität ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration der Zelle. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer vermehrten NO-Synthese. Es kommt hierbei zu einer kurzfristigen NO-Freisetzung in pico- bis nano-molaren Konzentrationen (Clancy, Amin et al. 1998). Die iNOS (induzierbare NO-Synthase) ist hingegen auch schon bei den normalerweise vorliegenden niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv. Grund hierfür ist, dass der Co-Faktor Calmodulin bei ihr im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Formen fest im Molekül verankert ist (Forstermann, Closs et al. 1994). Die Regulation erfolgt auf Ebene der Transkription durch Enzyminduktion statt durch Modulation der Enzymaktivität (Pfeilschifter, Eberhardt et al. 1996). Ihre Induktoren sind Entzündungsmediatoren wie proinflammatorische Zytokine oder auch LPS (Liew, Li et al. 1991). Folglich ist ihre Expressionsrate im Rahmen von Entzündungen erhöht. Viele Körperzellen sind in der Lage iNOS bei Bedarf zu exprimieren, darunter vor allem Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten (Stichtenoth 1997).

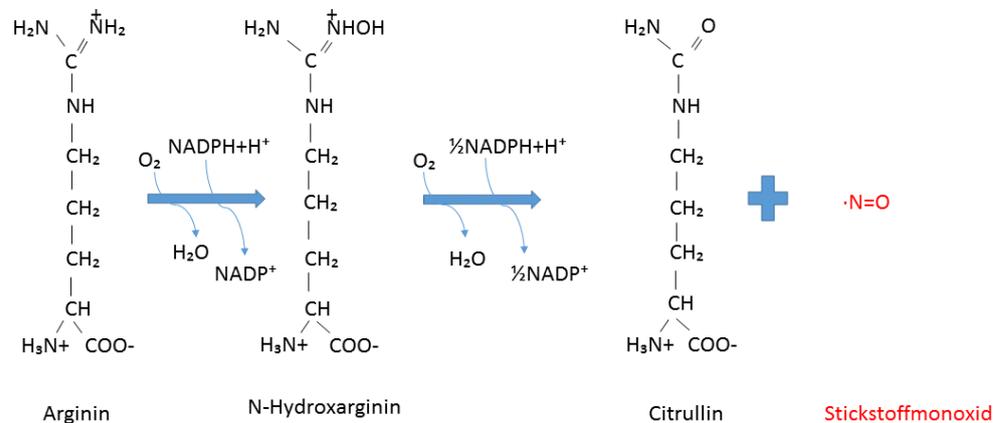


Abb. 4: Die Biosynthese von NO modifiziert nach Nathan (Nathan 1992)

NO-Synthasen katalysieren die Oxidation der Guanidino-Gruppe des Arginins. In zwei O_2 -abhängigen Reaktionsschritten wird je ein Sauerstoffatom des O_2 auf das Substrat übertragen, während das zweite Sauerstoffatom zu H_2O umgesetzt wird. NADPH dient als Reduktionsmittel.

Die Wirkungen des NO können in direkte und in cGMP-vermittelte Effekte unterteilt werden (Bernhard Brüne 1999, Joachim Rassow 2012). Als Radikal ist NO sehr reaktiv und im Gewebe nur wenige Sekunden stabil (Marletta 1994), bevor es mit Sauerstoff und Wasser zu Nitrit und Nitrat, den wichtigsten Ausscheidungsformen umgewandelt wird. Diese Reaktion läuft über die Bildung sogenannter Reaktiver-Stickstoff-Spezies als Zwischenprodukte ab (Burns, Walker et al. 1997). Sie zeigen eine höhere Reaktionsfreudigkeit als das NO selbst und interagieren ihrerseits mit verschiedenen Substraten (Klaus-D. Kröncke 2000). Je höher die zuvor produzierte Menge NO ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von RNS (Lancaster 2015).

Aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit kann NO aber auch mit anderen Substanzen wie Proteinen oder reaktiven Sauerstoffspezies reagieren. Besonders in höheren Konzentrationen kann es dadurch zu Gewebeschädigungen kommen. Makrophagen machen sich die toxischen Wirkungen des NO so beispielsweise zunutze, um phagozytierte Mikroorganismen in ihren Phagolysosomen abzutöten (Joachim Rassow 2012, S.634). Auch kann NO besonders in höheren Konzentrationen die Aktivität von Enzymen durch Nitrosierung ihrer freien Thiole beeinflussen. Hierzu wird ein Nitrosonium-Ion (NO^+) vom Reaktionsprodukt N_2O_3 auf eine SH-Gruppe eines Proteins übertragen. Diese S-Nitrosierung stellt einen wichtigen reversiblen Regulationsmechanismus zur Steuerung der Enzymaktivität dar (Stamler, Lamas et al. 2001). Auch die Mitglieder der Caspasen Familie enthalten einen Cystein-Rest, an welchem eine S-Nitrosierung erfolgen kann. Hierdurch kommt es zu einer Reduktion der Aktivität der Caspasen, worüber NO einen Einfluss auf die Apoptose

nehmen kann (Broillet 1999). Weiterhin können S-Nitrosoverbindungen auch als NO-Speicher fungieren, da das reversibel gebundene NO auch wieder freigesetzt werden kann (Kröncke, Fehsel et al. 1997). NO ist hydrophob und gasförmig und kann so frei durch die Zellmembran diffundieren. Deshalb spielt es trotz seiner kurzen Halbwertszeit auch eine wichtige Rolle als *second messenger*. So aktiviert NO die Guanylatzyklase, einen Hormonrezeptor, der bei Aktivierung wiederum den *second messenger* cGMP synthetisiert (Heinrich 2014). Zu den cGMP-vermittelten Wirkungen gehören neben der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und konsekutiver Vasodilatation auch die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie eine Verbesserung der Signalübertragung an Synapsen des Gehirns (Joachim Rassow 2012, S.634).

1.4.1 Stickstoffmonoxid und Entzündung

Unter physiologischen Umständen hat NO einen großen Einfluss auf die Regulation der mikrovaskulären Homöostase. Der Blutfluss wird in dem Fall durch von eNOS bereitgestelltes NO reguliert. Darüber hinaus hat NO auch in diesen Konzentrationen eine antiinflammatorische Wirkung. Es hemmt die Aktivität und Proliferation der T-Zellen, inhibiert die Produktion von Prostaglandin E2, Interleukin-6 und Thromboxan in Makrophagen und die Freisetzung von Histamin sowie plättchenaktivierendem Faktor aus Mastzellen (Stichtenoth 1997). Zusätzlich hemmt es die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur Adhäsion und Migration (Kubes, Suzuki et al. 1991). Doch NO spielt auch eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungen. Durch inflammatorische Reize kommt es zu einer Veränderung der Homöostase. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird beispielsweise durch IL-1 β , IL-6, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder auch durch bakterielle Bestandteile wie LPS aktiviert (Kilbourn and Belloni 1990). Sie ist in der Lage, über einen längeren Zeitraum von Stunden bis Tagen größere Mengen an NO zu produzieren (Beasley, Schwartz et al. 1991, Hemmrich, Kroncke et al. 2005). Diese liegen im mikromolaren Bereich und übersteigen die physiologische NO-Konzentration somit um den Faktor 100-1000 (Drapier, Wietzerbin et al. 1988, Pfeilschifter, Eberhardt et al. 1996). In diesen Konzentrationen wirkt NO toxisch gegen eine Vielzahl von Pathogenen wie zum Beispiel Bakterien, Pilze oder auch Tumorzellen (Hibbs, Taintor et al. 1988). Die iNOS ist jedoch nur unter aeroben Bedingungen aktiv, da die Reaktionsschritte von L-Arginin zu NO sauerstoffabhängig sind. Dennoch wird auch bei Ischämie-bedingter Hypoxie beispielsweise im Rahmen eines septischen Organversagens vermehrt NO gebildet. Es entsteht pH-abhängig nicht-enzymatisch aus Nitrit. Das Nitrit-Anion (NO₂⁻) liegt normalerweise in einem Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure (salpetrige Säure, HNO₂) vor. Aufgrund dieses Gleichgewichts ist konstant eine geringe Menge von HNO₂ vorhanden, welche wiederum im Gleichgewicht mit D-Stickstoff-Trioxid (N₂O₃) steht. Dieses reagiert zu NO und NO₂. Unter sauren Bedingungen wird dieses Gleichgewicht verschoben und so vermehrt NO gebildet. So kann NO in Phasen der Hypoxie dennoch die Durchblutung regulieren, um eine Ischämie zu verhindern (Lundberg,

Weitzberg et al. 1994, Lauer, Preik et al. 2001). Doch gleichzeitig macht die toxische Wirkung des NO auch nicht vor körpereigenen Zellen und Geweben halt, sodass eine Schädigung eigentlich gesunden Gewebes bei der unspezifischen Immunabwehr in Kauf genommen werden muss. Des Weiteren kommt es zu einem veränderten Blutfluss, welcher mancherorts zu Mikrozirkulationsstörungen mit konsekutiver Hypoxie führt. Diese wiederum kann die Entwicklung eines MOF im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion beeinflussen. Außerdem führt eine erhöhte Konzentration von Stickstoffmonoxid im Rahmen einer Sepsis zu einer Hypotension und einem schlechteren Ansprechen auf vasokonstriktorische Therapeutika (Boyle, Parvathaneni et al. 2000), sodass es zu einer Aggravation der Sepsis bis hin zum septischen Schock kommen kann.

1.5 Neutrophile Granulozyten und Stickstoffmonoxid

Es ist bekannt, dass die Migration neutrophiler Granulozyten durch verschiedene Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Stickstoffmonoxid reduziert wird. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der iNOS und eNOS zu einer vermehrten Adhäsion Neutrophiler führt (Benjamim, Silva et al. 2002, Tavares-Murta, Machado et al. 2001), wohingegen Neutrophile nach Zugabe von NO-Donoren sowohl eine verringerte Adhäsion als auch reduzierte Transmigration zeigen (Ialenti, Ianaro et al. 2000). Es wird vermutet, dass NO die Interaktion zwischen Neutrophilen und Endothelzellen beeinflusst, sodass die Migration erschwert wird. Die genauen Mechanismen sind nicht erforscht (Alves-Filho, Spiller et al. 2010). Auf der anderen Seite führt jedoch eine Hemmung der iNOS zwar zu einer normalen Migration der PMN, jedoch zeigen diese gleichzeitig eine reduzierte antimikrobielle Aktivität (Benjamim, Silva et al. 2002). Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Neutrophilen nach Zugabe von NOS-Inhibitoren nicht mehr in der Lage sind, NO herzustellen, welches sie für ihre zytotoxische Aktivität benötigen (Benjamim, Ferreira et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl PMN als auch NO wichtige Bestandteile der primären Immunabwehr sind. Beide dienen der schnellen Elimination eindringender Pathogene (Fang 2004). NO hat hierbei einen zweiseitigen Einfluss auf die PMN. Einerseits dient es als wichtiger Mediator der mikrobiziden Aktivität Neutrophiler, andererseits behindert es die Diapedese der PMN, welche Voraussetzung für nachfolgende Phagozytose oder *oxidative Burst* ist (Benjamim, Silva et al. 2002).

1.6. NO in Sepsis, Schock und Apoptose

Durch ein Trauma oder eine Infektion kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die iNOS wird aktiviert und es entsteht folglich eine deutlich erhöhte Konzentration an Stickstoffmonoxid (Clancy and Abramson 1995). Dieses dient einerseits als Teil der unspezifischen Immunantwort, indem es Pathogene abtötet (Hibbs, Taintor et al. 1988). Andererseits entsteht eine

ausgeprägte Vasodilatation, die mit einer veränderten mikrovaskulären Homöostase einhergeht (Moncada, Palmer et al. 1991). Hierdurch kommt es zu einer Katecholamin-refraktären Hypotension, einer Störung der vaskulären Autoregulation und einem Gewebeschaden (Moncada, Palmer et al. 1991, Avontuur, Bruining et al. 1997). Die Umverteilung des Blutflusses führt einerseits zu einem verminderten O₂-Angebot mit konsekutiver Gewebhypoxie. Andererseits entsteht diese jedoch auch durch eine reduzierte O₂-Extraktion (Fink 2002). Erschwerend kommt hinzu, dass NO die mitochondriale Atmungskette reversibel inhibieren kann. Das insgesamt verringerte O₂-Angebot und die gleichzeitig bestehende deutlich erhöhte NO-Konzentration führt zu einem Überwiegen des NO an den O₂-Bindungsstellen der Atmungskette (Borutaitė and Brown 1996). Zusätzlich entstehen bei O₂-Mangel und NO-Überangebot vermehrt Stickstoffradikale, welche zu einer irreversiblen Hemmung von Teilen der Atmungskette führen (Cassina and Radi 1996). So entsteht eine sogenannte zytopathische Hypoxie (Fink 1997). Auch konnte bei aktivierter iNOS die Anwesenheit von Nitrotyrosinen nachgewiesen werden. Durch Nitrosylierung kommt es zur Inaktivierung von SH-abhängigen Enzymaktivitäten beziehungsweise, eine Phosphorylierung von Enzymen durch Tyrosinkinase wird verhindert (Klaus-D. Kröncke 2000). Auch durch S-Nitrosylierung von Caspasen kommt es zu einer Beeinflussung deren Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass NO die Aktivität der Caspase 3 durch S-Nitrosylierung inhibiert. Dadurch wirkt NO antiapoptotisch (Haendeler, Weiland et al. 1997). Ebenfalls entstehen durch die erhöhte NO-Konzentration vermehrt Sauerstoff- und Stickstoffradikale, welche zu einem erhöhten oxidativen Stress beitragen (Uhle 2016). Gleichzeitig werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert (Hernandez, Grisham et al. 1987). Sie migrieren zum Infektfokus und bekämpfen die Pathogene (Nathan 2006). Mittels ihres *oxidative burst* tragen sie ebenfalls zu einer Steigerung des oxidativen Stresses bei (Botha, Moore et al. 1995). In der Frühphase der Sepsis soll NO hierbei einen steigernden Einfluss auf die neutrophile Phagozytose nehmen (Moffat, Han et al. 1996). Auch die antimikrobiellen Eigenschaften des NO selbst tragen zu einer verbesserten Elimination bei. Wohingegen es im weiteren Verlauf des septischen Geschehens zu einer Hemmung neutrophiler Migration und auch ihrer antimikrobiellen Eigenschaften durch NO kommt (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004). Auch kann die durch NO hervorgerufene Vasodilatation im Verlauf des septischen Geschehens zu einem septischen Schock mit konsekutiver Minderperfusion verschiedener Organe führen. Dies mündet häufig im septischen Organversagen.

2. Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Stickstoffmonoxid sowie der Einfluss proinflammatorischer Zytokine und LPS auf das Apoptoseverhalten der neutrophilen Granulozyten untersucht. Uns interessierte vor allem, ob Stickstoffmonoxid einen modulierenden Einfluss auf die neutrophile Apoptose nehmen kann und in welcher Form sich dieser äußerte. Wir untersuchten, ob dieser Einfluss je nach Kinetik des NO-Donors unterschiedlich ausfallen konnte und ob durch

proinflammatorische Zytokine präaktivierte Neutrophile anders auf NO reagierten als ruhende PMN. Auch untersuchten wir den Einfluss von LPS und proinflammatorischen Zytokinen auf die neutrophile Apoptose. Zusätzlich flossen weitere Faktoren wie Sport oder Stress des Spenders in unsere Untersuchungen mit ein.

Der Erkenntnisgewinn dieser Arbeit soll zu einem besseren Verständnis des Apoptoseverhaltens der Neutrophilen im Rahmen von Entzündungen beitragen. Die Relevanz dieser Arbeit wird deutlich, wenn man sich die zunehmende Inzidenz septischer Komplikationen nach einem Trauma bzw. Polytrauma oder auch im Rahmen von Entzündungen vor Augen führt (Martin, Mannino et al. 2003). Bei einem durch Hyperinflammation geschwächten Immunsystem kann sich leicht eine Sepsis entwickeln. Das große Ziel bleibt, in Zukunft neue Möglichkeiten in der Therapie von Sepsis und SIRS zu entwickeln, die auf zellulärer Ebene modulierend in das Inflammationsgeschehen eingreifen können.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Abzug	Waldner	Wangen, Deutschland
Blotkammer für Western Blot (<i>Novex Semi Dry Blotter</i>)	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Brutschrank (HeraCell 150)	Heraeus	Hanau, Deutschland
<i>Casting Frames</i>	BioRad	München, Deutschland
<i>Casting Stands</i>	BioRad	München, Deutschland
Chemolumineszenz-Detektion (CLD 88e)	Ecophysics	München, Deutschland
Dispergiergerät (Ultra-Turrax)	Welabo	Heppenheim, Deutschland
Durchflusszytometriegerät (FACSCalibur)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
Eis-Blocks	BioRad	München, Deutschland
Eismaschine (AF80)	Scotsman	Vernon Hills, Illinois, Vereinigte Staaten
Elektrophoresekammer (<i>mini- protean tetra cell</i>)	BioRad	München, Deutschland
Feinwaage (Kern ABJ)	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Geldokumentationsanlage (<i>Molecular Imager ChemiDoc</i>)	BioRad	München, Deutschland
Glasplatten für Gelelektrophorese (1,0 mm)	BioRad	München, Deutschland
Großzentrifuge (Megafuge 16R)	Heraeus	Hanau, Deutschland
Heizplatte (<i>dry bath</i> FB15101)	Fisher Scientific	Hampton, New Hampshire, Vereinigte Staaten
Kühlschrank (4 °C, -20 °C)	Liebherr	Bulle FR, Schweiz
Kühlschrank (-80 °C Hera freeze)	Heraeus	Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop (Axiovert 40C)	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (HeraSafe)	Heraeus	Hanau, Deutschland

Neubauer Zählkammer 0,0025 mm ² , Tiefe 0,100 mm	Hecht Assistent	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
pH Messgerät (HJ 221)	Hanna Instruments	Woonsocket, Rhode Island, Vereinigte Staaten
Photometer (Viktor ³ 1420)	Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pipetten, Eppendorf	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Schüttler (KM2)	Edmund Bühler GmbH	Bodelshausen, Deutschland
Schüttler (<i>see-saw rocker</i> SSL4)	Stuart	Stone (Staffordshire), Vereinigtes Königreich von Großbritannien
Spannungsquelle (<i>PowerPac</i> HC),	BioRad	München, Deutschland
Ständer und Rahmen für Gelelektrophorese	BioRad	München, Deutschland
Taumelrollenmischer (<i>rock'n'roller</i> RM5)	CAT	Deerfield, Illinois, Vereinigte Staaten
Thermomixer (Ikamag RH)	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik	Staufen im Breisgau, Deutschland
Tischzentrifuge (Fresco 17/ Pico 17)	Heraeus	Hanau, Deutschland
Ultraschallprozessor (UP50H mit Sonotrode MS1)	Hielscher Ultrasound Technology	Teltow, Deutschland
Vortexer (Labinco L46)	Welabo	Heppenheim, Deutschland
Waage (Kern 440-45)	Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Wasserbad mit Schüttelfunktion	Labortechnik Medingen	Dresden, Deutschland
Wasserbad (<i>Aqualine</i> AL12)	Lauda	Lauda-Königshofen, Deutschland

3.2 Materialien

3.2.1 Verbrauchsmaterialien

BioBlot Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm),	Bio-Rad	München, Deutschland
Blotting Filterpapier (Dicke 2,5 mm, 7,5:8,4 cm)	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Deckgläschen (24 x 32 mm)	VWR	Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Deckgläschen (15 mm)	VWR	Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
FACS Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
Falkonröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Fluoreszenzküvetten (Schichtdicke 10 mm, 340 nm, 10 x 4 x 45)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Heparin Blutröhrchen (LH102 I.U., 6 ml, 13 x 100 mm)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
<i>Imaging Plate</i> 24FC	Zell-Kontakt GmbH	Nörten-Hardenberg, Deutschland
Kombitips (0,5 und 5 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Mikrotiterplatten (12-, 24- und 96-well CELLSTAR®)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Pasteurpipetten (3 ml, makro graduert 150 mm, unsteril)	Ratiolab	Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen verschiedener Größen	StarLab	Hamburg, Deutschland
Plastikpipetten (5, 10 und 25 ml)	CoStar	Washington, D.C., Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Gasaustausch-schraubverschluss (Bodenfläche: 75 cm ² , 250 ml CELLSTAR®)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich

3.2.2 Chemikalien

30 % Acrylamid/Bis Solution 37,5:1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
10 % APS (Amoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
All-trans-Retinolsäure (ATRA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories	Cölbe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<i>ECL Western Blotting Substrate</i> , Pierce	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Na-Deoxycholot	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Nonidet-P40	Biomol	Hamburg, Deutschland
PonceauS - 0,1 % Ponceau	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Roti-Mark Western Set - 3 % Trichloressigsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</i> , Pierce	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

3.2.3 Lösungen und Puffer

Dulbecco's PBS - w/o Mg/Ca	Biochrom	Berlin, Deutschland
Lyse-Lösung („Lysis-Solution“) - 155 mM Ammoniumchlorid - 10 mM KHCO ₃ - 0,1 mM EDTA		
Physiologische Kochsalzlösung 0,9 %	DeltaSelect	München, Deutschland
Propidiumiodid Lösung - 0,1 % Natrium-Citrat - 0,1 % Triton-X-100 - 50 µg/ ml Propidiumiodid		
Tris HCL	Calbiochem (Merck)	Darmstad, Deutschland
Tris Base	Calbiochem (Merck)	Darmstadt, Deutschland
10 x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) - 7,7 mM Tris (pH 7,5) - 150 mM NaCl		
Blocking-Puffer - 5 % Magermilchpulver in TBS 0,1 % Tween		
Blotting-Puffer - 2 x Transferpuffer - 10 % Methanol		
4 x Laemmli-Puffer - 252 mM Tris-HCL (pH 6,8) - 40 % Glycerol - 8 % SDS - 0,01 % Bromphenolblau - Vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol frisch zusetzen		

Lauf-Puffer

- 25 mM Tris (pH 8,3-8,8)
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS

RIPA- Puffer

- 1 % Nonidet-P40
- 0,5 % Na-Deoxycholat
- 1 % SDS

In PBS

4 x Sammelgel-Puffer

- 0,5 M Tris (pH 6,8)
- 0,4 % SDS

Sammelgel

- 650 µl 30 % Acrylamid
- 3 ml H₂O
- 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer
- 10 µl TEMED
- 25 µl 10 % APS

Stripping Puffer

- 62,5 mM Tris (pH 6,8)
- 2 % SDS
- 100 mM Mercaptoethanol frisch zugesetzt

TBS-Puffer

- 7,7 mM Tris (pH 7,5)
- 150 mM NaCl
- Ad 1000 ml H₂O

25 x Transfer-Puffer

- 4 x Trenngel-Puffer
- 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,4 % SDS

10 %iges Trenngel (1 mm Dicke)

- 4,17 ml H₂O
- 1,67 ml 30 % Acrylamid
- 1,875 ml 4x Trenngelpuffer
- 10 µl TEMED
- 25 µl 10 % APS

1 %ige NO-Lösung

- 400 mg Nitrit
- 400 mg Ascorbat
- 40 ml Puffer (pH 5,5)

Mit A. dest. auf gewünschte Konzentration verdünnen

Puffer (pH 5,5)

- 100 ml Aqua dest.
- 9,6 ml Essigsäure (96 %)
- mit 1 M Natronlauge auf pH 5,5 titrieren

CLD Reaktionslösung

- 45 mM Kalium-Iodid 756 mg/100 ml
- 10 mM I₂ 266 mg/ 100 ml
- 7,4 ml H₂O
- 100ml Eisessig

3.2.4 Medien und Zusätze

DETA-NO	Institut für Biochemie &Molekularbiologie I, Heinrich-Heine- Universität	Düsseldorf, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories	Cölbe, Deutschland
IL1 β	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
INF γ	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
L-NIO dihydrochloride	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, Texas, Vereinigte Staaten
LPS	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Penicillin/Streptomycin	PAA, Laboratories	Cölbe, Deutschland
Percoll	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI-1640 Medium - w 2,0 g/l NaHCO ₃ - w stable glutamine (2 mM)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Staurosporin (STS)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, Vereinigte Staaten
TNF α	Peprtech	Rocky Hill, New Jersey, Vereinigte Staaten

3.2.5 Antikörper

Anti-MCL1-Antikörper (monoklonal) Maus anti Mensch	BD PharMingen	San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Anti-PARP-Antikörper Hase anti Mensch	Cell Signaling	Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten

3.2.6 Zellen

Humane myeloide Leukämie- Zelllinie (HL-60)	Institut für med. Mikrobiologie, Heinrich-Heine Universität	Düsseldorf, Deutschland
---	--	-------------------------

3.2.7 Software

- CellQuestPro	für durchflusszytometrische Messungen, Becton Dickinson
- EndNote X7.7.1, 2016	für Zitate und das Literaturverzeichnis, Reuters
- Microsoft Office 2020	für die schriftliche Ausarbeitung der Dissertation
- Spiroware (Eco Physics)	CLD-Software
- SPSS Version 25, 2017	für die statistische Datenanalyse

3.3 Methoden

3.3.1 Probanden

Für die Versuche diente Blut freiwilliger gesunder Spender. Insgesamt 22 verschiedene Probanden im Alter von 21 bis 52 Jahren, davon 10 Männer und 12 Frauen, spendeten ihr Blut für die Experimente. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf hat der „Entnahme von Blutproben zur Bestimmung humoraler zellulärer Blutparameter“ zugestimmt (Studiennummer 4477, 11. Dezember 2013).

3.3.2 Methoden der Zellkultur

Isolierung humaner PMN

Die humanen PMN wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Percoll aus mit Heparin versetztem venösen Vollblut isoliert. Hierzu verwendeten wir eine Dichte des Gradienten von

1,086. Zu diesem Zweck wurden 5 ml einer Percoll-Lösung der Dichte 1,124 ng/ ml mit 3,4 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. Diese verdünnte Percoll-Lösung wurde in ein 15 ml Falcon gefüllt und mit 5 ml venösem Vollblut überschichtet. Hierbei war darauf zu achten, dass sich die zwei verschiedenen Phasen nicht durchmischten. Anschließend wurde das gefüllte Falcon für 23 min bei 2000 rpm (ohne Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert.

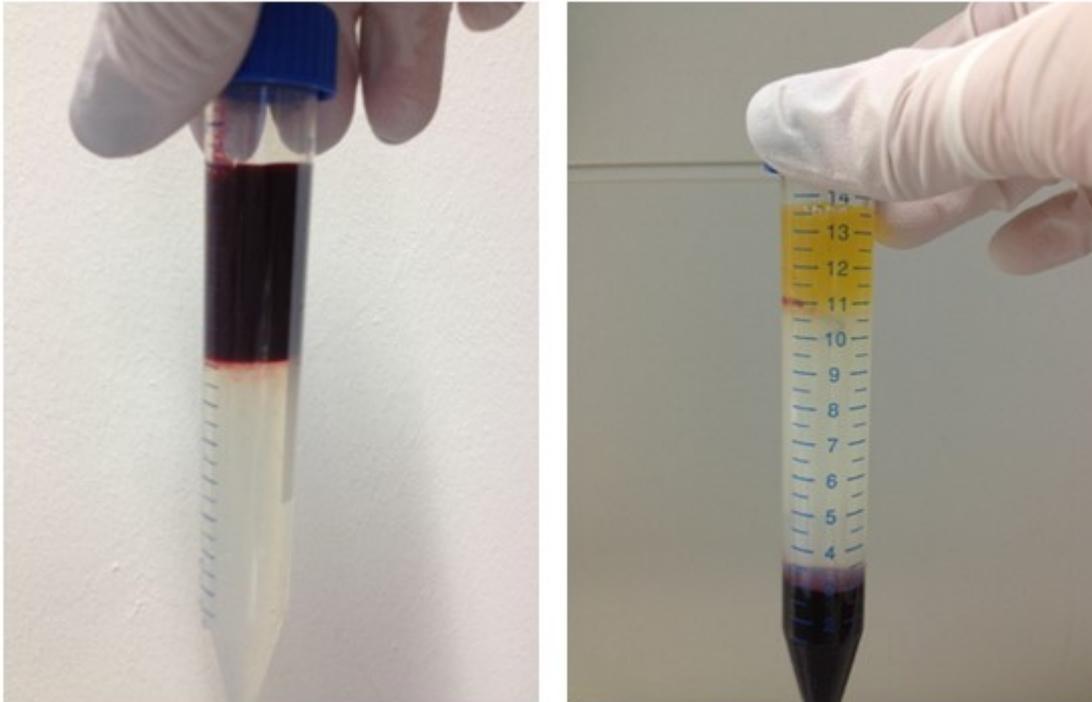


Abb. 5: Zentrifugenröhrchen vor und nach Dichtegradientenzentrifugation

8,4 ml verdünnte Percoll-Lösung wurde mit 5 ml heparinisiertem venösem Vollblut überschichtet, eine Vermischung der Phasen war zu vermeiden. Nach dem Zentrifugationsschritt (23 min, 2000 rpm ohne Bremse bei RT) sammelte sich in der oberen Schicht das Plasma, darunter in der Interphase folgten die mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten). Die PMN und die Erythrozyten befanden sich im Sediment.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte sammelten sich die zellulären Bestandteile des Blutes in verschiedenen Phasen. Die mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) sammelten sich in der Interphase (zwischen Serum und Percoll) und die Erythrozyten sowie die PMN im Sediment (Pellet) unterhalb des Percoll. Der Überstand bis zum Pellet wurde nun mithilfe einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit wenigen Millilitern Ammoniumchlorid-Lösung zur Lyse der Erythrozyten versetzt und anschließend in ein mit Ammoniumchlorid-Lösung gefülltes 50 ml Falcon überführt. Dieses wurde zur Unterstützung der Erythrozytenlyse für sieben Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm (mit Bremse) für fünf Minuten bei einer Temperatur von 4 °C. Hiernach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in wenigen Millilitern phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen. Es schlossen sich ein weiterer Zentrifugationsschritt und ein weiterer Waschschrift an.

Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen zu neutrophil-ähnlichen Zellen

Bei den HL-60 Zellen handelt es sich um eine lymphoide Zellreihe, welche von einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie stammt. Durch Isolierung peripherer Leukozyten aus ihrem Blut konnte die immortalisierte, wachstumsfaktorunabhängige Zelllinie der HL-60 Zellen etabliert werden. Der überwiegende Zelltyp in dieser Zelllinie ist der Promyelozyt (Gallagher, Collins et al. 1979). Je nach Zugabe eines Induktors können sich diese Zellen jedoch beispielsweise zu Makrophagen-ähnlichen Zellen oder auch zu Neutrophil-ähnlichen Zellen differenzieren (Fontana, Colbert et al. 1981). Zur Differenzierung hin zu Neutrophil-ähnlichen Zellen verwendeten wir ATRA (a-trans-Retinolsäure) in einer Konzentration von 1 μM . Die Zellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium (RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S) in Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75 cm^2 ausgesät. Die Zelldichte betrug hierbei 1 x 10⁵ Zellen/ ml. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C sowie 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Konzentration im Brutschrank für fünf Tage mit ATRA inkubiert. Eine Flasche mit unbehandelten HL-60 Zellen, die als Kontrollzellen dienten, wurde ebenfalls für fünf Tage nur mit Medium inkubiert. Bevor am sechsten Tag mit den Zellen gearbeitet werden konnte, wurde der Erfolg der Differenzierung mittels FACS-Analyse überprüft. Mit ATRA behandelte Zellen zeigten hierbei eine ca. zehnfache Erhöhung der Apoptose im Vergleich zu den nicht mit ATRA behandelten Kontrollzellen.

Bestimmung der Zellzahl

Um eine bestimmte Anzahl an Zellen pro *well* aussähen zu können, wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde zu diesem Zweck im Verhältnis 1:4 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Als anionischer Diazofarbstoff kann Trypanblau nur die Zellmembran toter Zellen passieren und diese somit blau anfärben. So konnten tote Zellen von vitalen Zellen lichtmikroskopisch differenziert werden. Die vier großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer wurden ausgezählt und anschließend mit folgender Formel die Zellzahl errechnet: (gezählte Zellen x 10⁴) / 4 = Zellen/ ml. Hierbei ist 10⁴ der Kammerfaktor.

Zellkultur

Die Versuchsansätze sahen eine Konzentration von 2 x 10⁶ PMN bzw. HL-60 Zellen pro Milliliter Medium vor. Bei einer 48 *well*-Platte setzten wir ein Gesamtvolumen von 300 μl pro *well* ein. Bei 24 *well*-Platten verwendeten wir ein Gesamtvolumen von 1 ml pro *well*. Die Versuche wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt, sodass jeweils zwei benachbarte *wells* die gleiche Behandlung erhielten. Als Medium verwendeten wir RPMI, welches mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) sowie 5 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 0,4 μM Staurosporin (STS) zu den PMN in die vorgesehenen *wells*. Nach insgesamt 18 Stunden Inkubation wurden die *well*-Platten wieder aus dem Brutschrank entnommen

und die Zellen für die Analyse mittels Durchflusszytometrie vorbereitet. Außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Zellen zur späteren Proteinbestimmung bei -80 °C eingefroren. Der Überstand des Mediums wurde zur Analyse mittels Griess-Assay entnommen.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (*fluorescent-activating cell sorting*, FACS) handelt es sich um eine Laser-gestützte Methode zur Quantifizierung optischer Eigenschaften kompletter Zellen oder von Zellpartikeln. So können mit Hilfe des FACS Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen bestimmt werden. Die Apoptoserate von PMN bzw. HL-60 Zellen wurde mittels der Methode nach Nicoletti, welche er 1991 etablierte (Nicoletti, Migliorati et al. 1991), bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit verdünntem Propidiumiodid (PI) versetzt. PI ist ein Fluorochrom, welches sich stöchiometrisch an die Nukleinsäuren bindet (Wallen, Higashikubo et al. 1982). Die Emission von PI im FACS ist somit proportional zur Konzentration fragmentierter DNA. Da nekrotische Zellen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen keine fragmentierte DNA aufweisen, gelingt so ein sicherer Nachweis der apoptotischen PMN. Neben PI enthält die Nicoletti-Lösung auch noch das Detergenz Triton X-100, welches die Zellmembran, jedoch nicht die Kernmembran, lysiert. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Zellkerne intakt bleiben und nur der zelluläre DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie erfasst wird. Nachdem die Zellen für 18 Stunden in Kultur genommen wurden, wurde die Apoptoserate bestimmt. Die Zellpellets wurden hierzu in $200\text{ }\mu\text{l}$ verdünntem PI resuspendiert und für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels FACS. Es wurden 10.000 Zellen pro Probe gemessen. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Zellen in einer Probe bestimmt, welcher den hypodiploiden sub-G1-Peak aufwies. Dieser sub-G1-Peak entspricht der fragmentierten DNA und ist daher ein Nachweis für apoptotische Zellen. Er ist schwächer fluoreszierend und zeigt sich im Vergleich zum schmalen Peak der Zellen mit diploidem DNA-Satz deutlich verbreitert.

3.3.4 Griess-Assay

Nach der 18-stündigen Inkubation der Zellen im Brutschrank unter Zusatz der entsprechenden Reagenzien, wurde der Nitritgehalt im Medium mittels Griess-Assay bestimmt. Der Assay wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Absorbionsmessung bei 540 nm durchgeführt.

3.3.5 Western Blot

Mittels Western Blot ist es möglich, Proteine auf eine Membran zu übertragen (blotten) und diese anschließend mittels Immundetektion sichtbar zu machen.

Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration in der Probe

Bei den Proben handelte es sich um Zellpellets verschiedener Probanden, welche nach Isolierung und 18-stündiger Kultivierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren worden waren. Diese Zellpellets wurden in $30\text{ }\mu\text{l}$ RIPA-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschallprozessor (UP50H, Hielscher Ultrasound Technology) sonifiziert (Sonotrode MS1, Amplitude 80 %, 0,5 Zyklen). Nun wurde die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt. Hierfür wurde ein Teil der Proben nach der Sonifizierung im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt und als Duplikate auf eine 96 *well*-Platte aufgetragen. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ebenfalls ein Standard auf die 96 *well*-Platte aufgetragen (0,0125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2 mg BSA/ ml PBS). Anschließend wurde in jedes *well* zusätzlich $200\text{ }\mu\text{l}$ BCA *working reagent* hinzugegeben. Damit sich alles gut durchmischte, wurde die Platte 30 Sekunden bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Daraufhin folgte eine dreißigminütige Inkubationszeit bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, an welche sich schlussendlich die quantitative Proteinmessung mithilfe eines Photometers (VICTOR³, Perkin Elmer) anschloss.

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bevor die Proteine auf die Membran aufgetragen werden konnten, wurden sie mithilfe eines Polyacrylamid-Gels ihrer Größe nach aufgetrennt. So konnte das individuelle Molekulargewicht der verschiedenen Proteine ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden $40\text{ }\mu\text{g}$ des Gesamtproteins zunächst 4:1 mit Lämmli-Puffer versetzt und für sieben Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die Proteine durch das anionische Detergenz SDS, welches im Lämmli-Puffer enthalten ist, alle eine negative Ladung erhielten, die ihre eigene Ladung überdeckte. Das war notwendig, damit die Proteine später im Gel alle gerichtet zur Anode hinlaufen und so entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden konnten. Des Weiteren dienten SDS und das ebenfalls im Lämmli-Puffer enthaltene Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine und zur Spaltung der Disulfidbrücken. So lagen die Proteine in Form von Polypeptiden vor, wodurch ihre Länge jeweils proportional zu ihrem Molekulargewicht war. Es wurde dann eine diskontinuierliche Gelelektrophorese mit Sammel- und Trenngel durchgeführt. Die Größe des Trenngels ist dabei abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins. In diesem Fall wurden 10 %ige Trenngele für Proteine mit einer Größe von 30-120 kDa verwendet. Die mit Lämmli-Puffer versetzten Proben wurden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. In eine Tasche wurde ein Standard ($3\text{ }\mu\text{l}$ Roti Anti Western Marker) gegeben, anhand dessen man später die Größe der Proteine ablesen konnte. Die Proben durchliefen das Sammelgel bei einer angelegten Spannung von 60 Volt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann bei einer angelegten Spannung von 120 Volt. Zunächst durchliefen die Proteine das Sammelgel, in welchem sie zu einer schmalen Bande konzentriert wurden, danach gelangten sie in das feinporige Trenngel, welches sie nach ihrer Größe auftrennte. Als Laufpuffer diente ein Tris/Glycin-System.

Transfer

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde der Gel-Lauf gestoppt, sobald der Marker begann auszulaufen. Das Gel wurde daraufhin kurz im Blotting-Puffer äquilibriert. Auch die Membran, auf welche die Proteine übertragen werden sollten und die benötigten Filter- bzw. Blotting-Papiere wurden zunächst mit dem Blotting-Puffer befeuchtet. Durch das enthaltene Methanol wurde die Membran so aktiviert. Der Aufbau des Transfers erfolgte dann folgendermaßen: Die Membran wurde auf ein Filterpapier in einer Kassette gelegt, auf die Membran wurde das Gel gelegt, welches wiederum mit einem Filterpapier bedeckt wurde. Der Deckel wurde geschlossen und der Transfer mit einer angelegten Spannung von 23 Volt gestartet. Aufgrund sowohl ionischer als auch polarer Wechselwirkungen blieben die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran haften, wodurch die nachfolgende Immundetektion erst möglich wurde. Die korrekte Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran wurde nach jedem Blot mittels Ponceau-Färbung überprüft. Bei PonceauS handelt es sich um 3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(4sulfophenylazo)-phenylazo)-2,7-naphthalendisulfonsäure, welche Proteinbanden auf der Membran unspezifisch rot anfärbt. Zusätzlich hat sie durch die enthaltene Trichloressigsäure auch fixierende Eigenschaften, sodass die Proteine stärker an die Membran gebunden werden. Die Membran wurde für zwei bis drei Minuten in ein Schälchen mit PonceauS gegeben. Nach erfolgreichem Nachweis von Proteinbanden auf der Membran wurde diese im Anschluss mehrmals mit Wasser und PBS und zum Schluss auch einmalig mit TBS-T gewaschen.

Immundetektion

Vor der eigentlichen Immundetektion mussten alle unspezifischen Bindungsstellen geblockt werden, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Standardmäßig wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur in der entsprechenden Blockierungslösung inkubiert. Die Wahl der Blockierungslösung hing hierbei von dem zu verwendenden Antikörper ab, da die freien Bindungsstellen mit einem, von dem Antikörper nicht zu erkennenden, Protein blockiert werden sollten. Vor der Behandlung der Membran mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als primärem Antikörper wurde 5 % BSA in TBS-T als Blockierungslösung verwendet. Für die anderen, in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, wurde 5 % Magermilch in TBS-T als Blockierungslösung verwendet. Im Anschluss daran wurde die Membran mit einem gegen das entsprechende Zielprotein spezifischen primären Antikörper entsprechend der Herstellerangaben inkubiert.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten primären Antikörper

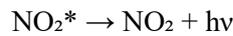
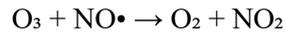
Primärer Antikörper	Inkubationslösung	Verdünnung	Inkubation

anti-Mcl-1	1 % Milchpulver in TBS-T	1:300	2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C
anti-PARP	5 % Milchpulver in TBS-T	1:1000	Über Nacht bei 4 °C
anti-GAPDH	3 % BSA in TBS-T	1:7500	1 h bei RT

Hiernach wurde die Membran erneut dreimal für je fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (*goat anti mouse* oder *goat anti rabbit*) in TBS-T für eine Stunde im Dunkeln. Hieran schlossen sich drei erneute Waschschritte mit TBS-T im Dunkeln an. Zuletzt erfolgten die Detektion und Visualisierung mittels Chemilumineszenz. Das Licht wurde in der Geldokumentationsanlage mithilfe des ChemiDoc XRS Programms (BioRad) auf der Membran detektiert. Hierbei korrelierte die Spontanintensität auf der Membran mit der Menge des entsprechenden Proteins. Somit erlaubte die Bestimmung der Spontanintensität Rückschlüsse auf die relative Menge der Proteine auf der Membran. Für die semiquantitative Auswertung der Proteinexpression wurde die Membran mit dem Antikörper gegen das Protein GAPDH reinkubiert. Diesem Schritt ging das Strippen der Membran voraus. Dabei wurden die an der Membran haftenden Antikörper entfernt und somit eine zweite Inkubation der Membran mit einem primären Antikörper ermöglicht. Dazu wurde die Membran für 20 Minuten bei 60 °C mit Mercaptoethanol- und SDS-haltigem Stripping-Puffer unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden Mercaptoethanol und SDS von der Membran durch mehrmaliges Waschen mit Wasser und PBS entfernt. Zuletzt wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen.

3.3.6 Chemilumineszenzdetektion

Mittels eines Chemilumineszenzdetektors (CLD) ist es möglich, NO-Konzentrationen bis in den ppb -Bereich (*parts per billion*) hinein zu bestimmen. Wir nutzten die Methode, um die NO-Konzentration einer Lösung zu messen, mit welcher anschließend die isolierten PMN inkubiert wurden. Es handelt sich um eine Messmethode, bei welcher als Folge einer chemischen Reaktion eine Lichtemission entsteht. Die Reaktionslösung bestand aus 45 mM Kaliumjodid und 10 mM Iod, welche zusammen in 100 ml Eisessig gelöst wurden. Durch die Reduktion der Probe mit der Reaktionslösung ging das entstandene NO in die Gasphase über. Bevor das Gas in den Analysator geleitet wurde, wurden Säure und Jodid mit Hilfe einer 1 M Natronlauge (NaOH) entfernt. Anschließend gelangte das Gas in den Analysator (Feelisch, Rassaf et al. 2002). Der Analysator erzeugte Ozon, welches nach folgenden Reaktionsgleichungen mit dem Stickstoffmonoxid reagierte.



Durch die Reaktion von Ozon und Stickstoffmonoxid entsteht Sauerstoff und Stickstoffdioxid. Ein Teil des NO_2 liegt nach dieser Reaktion zunächst in einem angeregten Zustand (NO_2^*) vor. Die Elektronen haben zu diesem Zeitpunkt ein erhöhtes Energieniveau. Es handelt sich hierbei jedoch um einen instabilen Zustand, weshalb die Elektronen nach kurzer Zeit auf ihr normales Energieniveau zurückkehren. Die Differenz dieser beiden Energieniveaus wird als elektromagnetische Strahlung ($h\nu$) abgegeben. Da diese eine Wellenlänge hat, welche im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegt, kann sie mittels eines Photomultipliers gemessen werden (Clough P.N. 1966). Die Intensität des Lichtes ist hierbei direkt proportional zur gemessenen NO-Menge (Hampl V. 1996). Es erfolgte die Darstellung der Impulse in einem Diagramm. Die Fläche unterhalb der Kurve war hierbei proportional zur gemessenen NO-Konzentration.

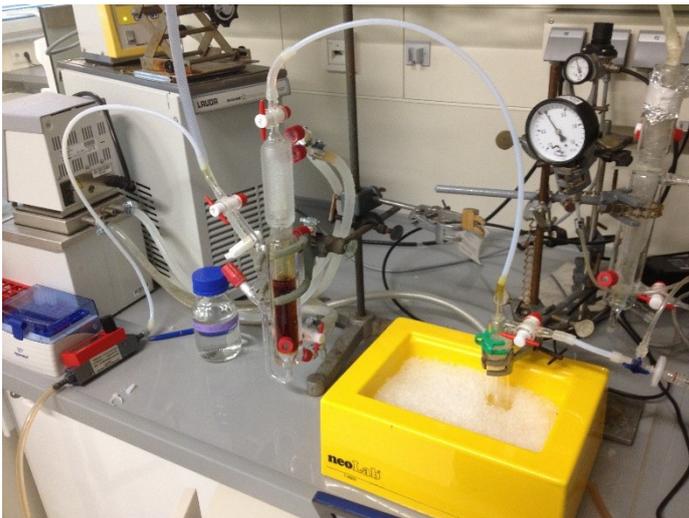


Abb. 6: Aufbau eines Chemilumineszenzdetektors

3.3.7 DETA-NO (Diethylenetriamine-nitric oxide)

Das DETA-NO wurde uns freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. DETA-NO setzt pro Mol 2 Mol NO frei und hat bei 37 °C eine Halbwertszeit von 20 Stunden (Miller and Megson 2007). Zur Herstellung einer 5 mM Lösung von DETA-NO wurden 0,89 mg DETA-NO mit 997 μl Medium (RPMI + Hepes) und 3 μl einer 1-molaren Salzsäure versetzt. Die 5 mM Lösung wurde steril filtriert und anschließend entsprechend der

gewünschten Konzentration mit Medium (RPMI) weiter verdünnt. Für die Versuche wurden verschiedene Konzentrationen von 2,5 μM bis 100 μM verwendet.

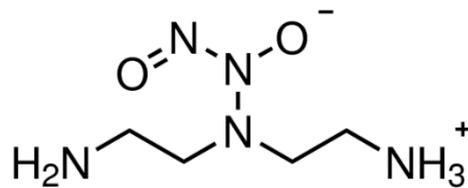


Abb. 7: DETA-NO

3.4 Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler angegeben. Alle Daten wurden mit dem Programm *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (Version 25, 2017) für Windows (2020) analysiert. STS-resistente Probanden wurden von den Berechnungen ausgeschlossen oder gesondert dargestellt. Eine STS-Resistenz lag vor, wenn nur mit STS behandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keinen Anstieg der Apoptoserate in der *FACS*-Analyse zeigten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels univariater Varianzanalyse. p -Werte $< .05$ wurden als signifikant bewertet. Mittelwertunterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des t -Tests für unabhängige Stichproben inferenzstatistisch abgesichert. Bei allen verwendeten parametrischen Tests wurden die jeweiligen Voraussetzungen geprüft und bei groben Verletzungen entsprechende Konsequenzen gezogen. Zur Identifikation von Gruppenunterschieden im Rahmen von Varianzanalysen wurden der Bonferroni und der Tukey-Test als post hoc Tests verwendet. Die Anzahl der gleichen, voneinander unabhängigen Experimente für die jeweiligen Versuche wurde als n -Zahl angegeben.

4. Ergebnisse

Es ist bekannt, dass Neutrophile im Rahmen einer Inflammation eine deutlich verlängerte Lebensspanne zeigen. Grund hierfür ist eine verzögerte intrinsische Apoptose, welche unter anderem durch eine erhöhte Konzentration an Zytokinen ausgelöst wird (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Im Rahmen einer Sepsis und insbesondere bei einem septischen Schockgeschehen steigt außerdem die Konzentration von Stickstoffmonoxid. Die iNOS produziert hierbei NO in μM -Konzentrationen (Rastaldo, Pagliaro et al. 2007). Um herauszufinden, ob eine erhöhte NO-Konzentration selbst auch einen direkten Einfluss auf das Apoptoseverhalten Neutrophiler haben kann, untersuchten wir den Einfluss erhöhter Stickstoffmonoxidkonzentrationen auf die Apoptoserate der Neutrophilen von gesunden Spendern. Zur Induktion der Apoptose der PMN verwendeten wir Staurosporin, ein Zellgift, welches den intrinsischen Apoptosesignalweg in Neutrophilen aktiviert (Bruno, Ardelt et al. 1992).

4.1 DETA-NO 10 bis 100 μM zeigt keinen Einfluss auf die Apoptose

Zunächst untersuchten wir den Einfluss von DETA-NO in den Konzentrationen 10-100 μM auf die spontane Apoptose und die induzierte Apoptose der neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden. Hierzu wurden PMN nach der Isolation aus humanem Blut in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml auf einer 48-*well* Platte ausgesät. Als Medium wurde jedem *well* anschließend 300 μl RPMI mit 1 % P/S sowie 5 % FCS hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von DETA-NO in den entsprechenden Konzentrationen. Nach einer Vorinkubation von einer Stunde im Brutschrank erhielten die vorgesehenen *wells* zusätzlich Staurosporin in einer Konzentration von 0,4 μM pro *well* als Induktor der Apoptose. Nach anschließender insgesamt 18-stündiger Inkubation und darauffolgender *FACS*-Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied sowohl der spontanen als auch der durch STS induzierten Apoptoseraten von mit DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

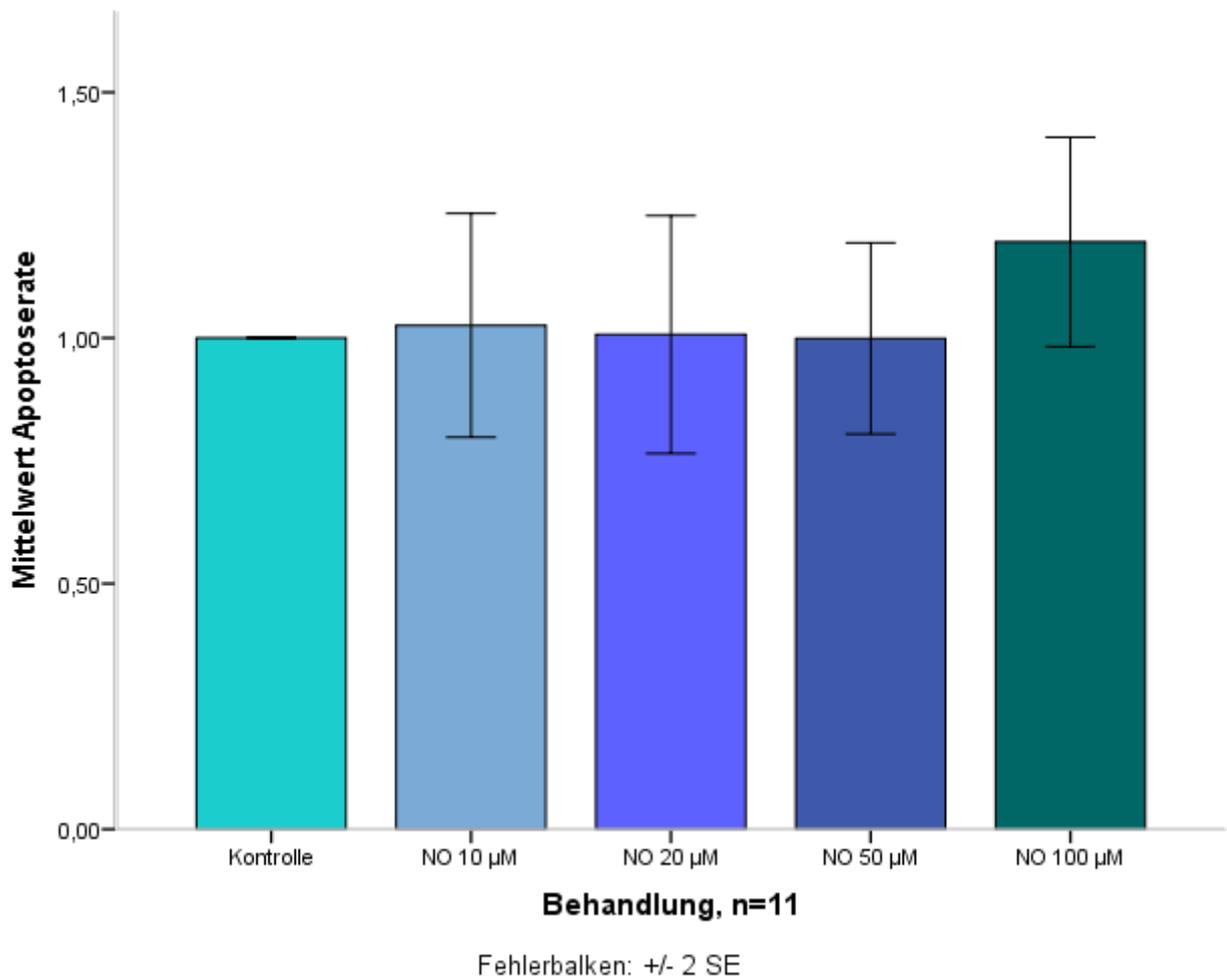


Abb. 8: Der Einfluss von DETA- NO (10-100 µM) auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 8 zeigt die spontane Apoptose von mit DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert der einzelnen Behandlungen aufgetragen. Hierbei ist die Apoptoserate der Kontrolle auf 1 gesetzt. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=11, $F(4/50)=0.739$ $p=.570$

Hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss ($F(4/50)=0.739$ $p=.570$). Der große Standardfehler zeigt, dass es deutliche interindividuelle Unterschiede in Bezug auf die Höhe der spontanen Apoptose in Abhängigkeit vom Spender gab. Dennoch waren im Mittel unabhängig von der zugeführten Konzentration des DETA-NO die Apoptoseraten nahezu gleich.

Auch auf die Staurosporin (STS)-induzierte Apoptose nahm DETA-NO in den Konzentrationen von 10 bis 100 µM keinen signifikanten Einfluss $F(4/40)=0,195$, $p=.940$.

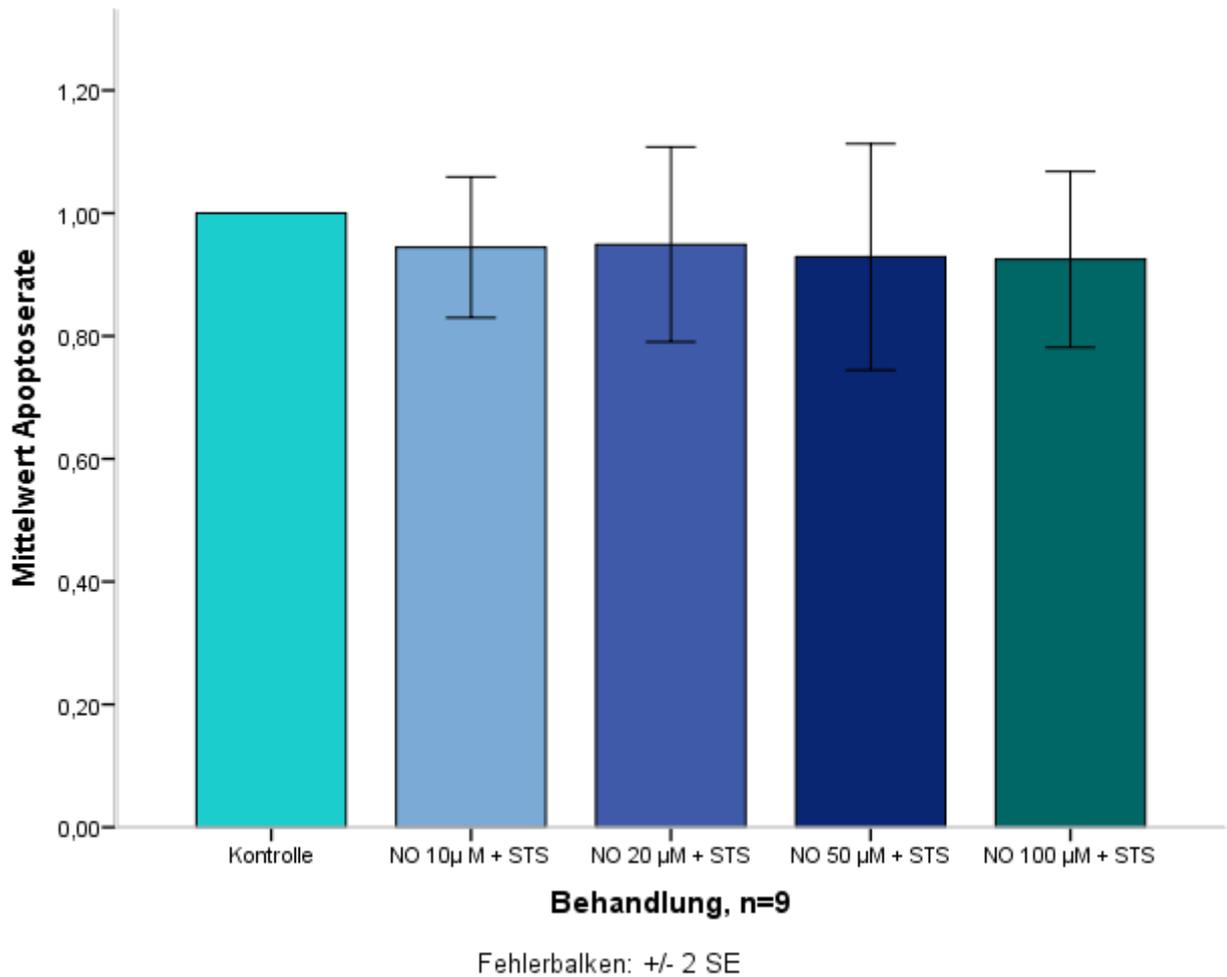


Abb. 9: Der Einfluss von DETA-NO (10-100 µM) auf die STS induzierte Apoptose der PMN

Abbildung 9 zeigt die durch STS-induzierte Apoptose der mit DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur STS-induzierten intrinsischen Apoptose der Kontrollzellen. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Der linke Balken zeigt die induzierte Apoptose der nicht mit DETA-NO behandelten Kontrollzellen. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert der einzelnen Behandlungen aufgetragen. Hierbei ist die Apoptoserate der Kontrolle auf 1 gesetzt. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=9, $F(4/40)=0,195$ p=.940

Dennoch zeigten sich bei einigen Spendern reduzierte Apoptoseraten der induzierten Apoptose nach Behandlung mit DETA-NO. Abbildung 10 und 11 geben hierfür zwei Beispiele.

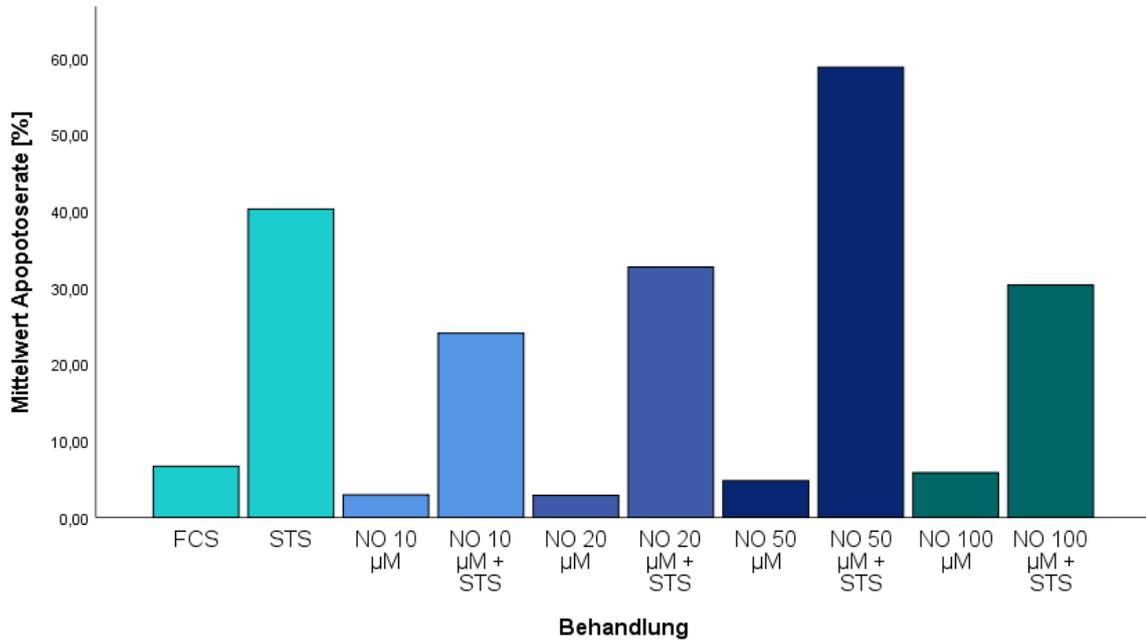


Abb. 10: Reduktion der durch STS induzierten Apoptose bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN
 Abbildung 10 zeigt ein Beispiel für eine reduzierte induzierte Apoptose nach Behandlung mit DETA-NO. Auf der X-Achse ist die Behandlung der Zellen in den einzelnen *wells* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate in % angegeben. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

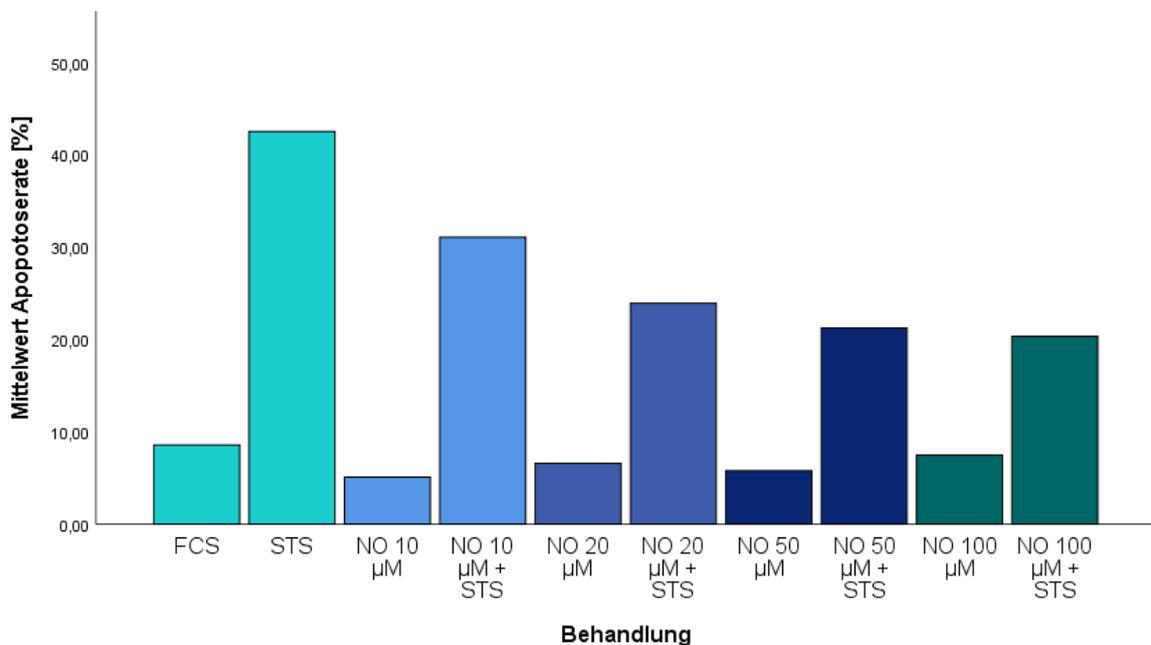


Abb. 11: Reduktion der durch STS induzierten Apoptose bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN
 Abbildung 11 zeigt ein weiteres Beispiel für eine reduzierte induzierte Apoptose nach Behandlung mit DETA-NO. Auf der X-Achse ist die Behandlung der Zellen in den einzelnen *wells* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate in % angegeben. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

4.2 Staurosporin-resistente PMN

Auch fiel auf, dass die Neutrophilen mancher Spender eine Resistenz gegen den Apoptose-Induktor STS aufwiesen. Diese ließ sich jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt bei den entsprechenden Spendern reproduzieren. Wir schlussfolgerten, dass die Resistenz gegen Staurosporin von äußeren Faktoren abhängen könnte und nicht permanent bei gewissen Spendern ausgebildet war. Abbildung 12 zeigt die Apoptoseraten zweier STS-resistenter Probanden.

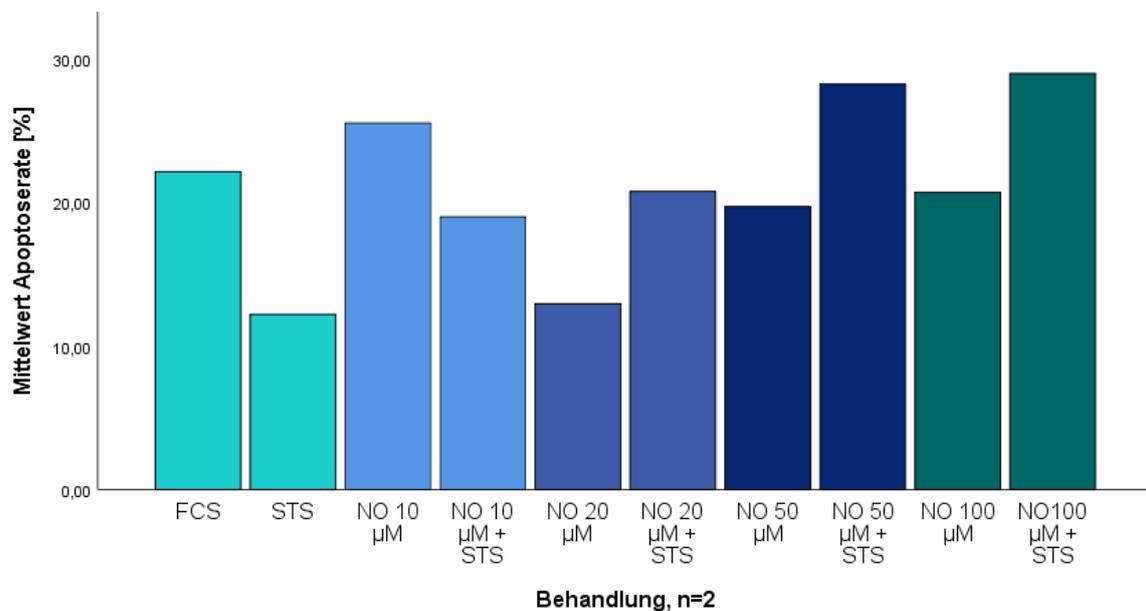
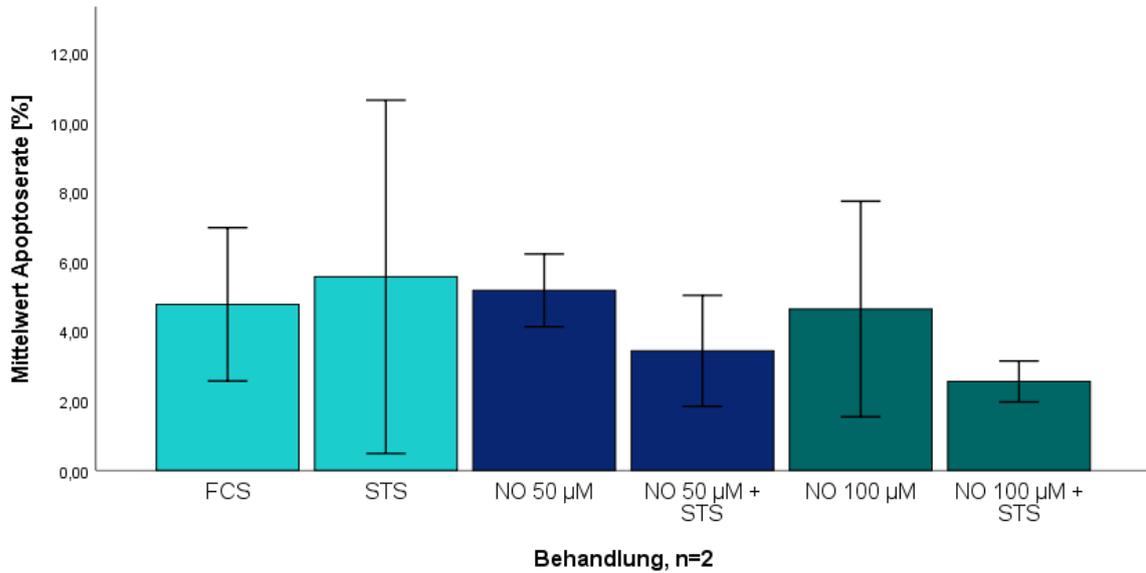


Abb. 12: STS-Resistenz bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN

Abbildung 12 zeigt die deutlich verringerte induzierte Apoptose. Es ließ sich in den Zellen durch STS nicht wie üblich eine intrinsische Apoptose induzieren. Vielmehr zeigten sich teils sogar verringerte Apoptoseraten verglichen mit der Rate der spontanen Apoptose. Auf der X-Achse ist die Behandlung der Zellen in den einzelnen *wells* aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate in % angegeben. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

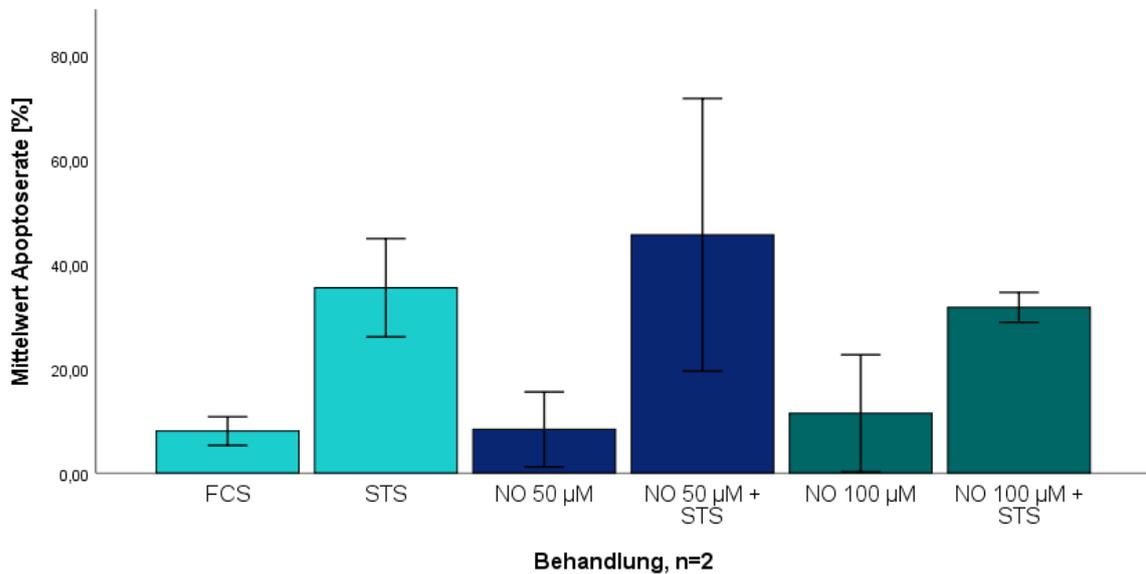
Wir untersuchten in nachfolgenden Experimenten, ob wir eine Staurosporin-Resistenz durch bestimmtes Verhalten der Spender vor der Blutentnahme provozieren konnten. So konnten wir beispielsweise eine Staurosporinresistenz nach vorausgegangener großer sportlicher Betätigung bei Spendern, welche sonst keine Staurosporin-Resistenz aufwiesen, hervorrufen. Eine Gegenüberstellung hierzu findet sich in Abbildung 13 und 14. Die durch Sport präaktivierten Neutrophilen zeigten hierbei Apoptoseraten von maximal bis zu 10 %. Wohingegen zu einem anderen Zeitpunkt bei den gleichen Spendern durch Staurosporin im Mittel eine Apoptoserate von 35 % erzielt werden konnte.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 13: provozierte STS-Resistenz nach sportlicher Betätigung

Abbildung 13 zeigt das Apoptoseverhalten der PMN zweier Spender, welche am Tag vor der Blutentnahme exzessiv Sport getrieben haben. Die PMN zeigten eine Resistenz gegenüber dem Apoptoseinduktor STS. X-Achse: Behandlung der PMN in den verschiedenen wells. Y-Achse: Apoptoserate in %. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 14: induzierte Apoptose durch STS ohne vorangegangene sportliche Betätigung

Zum Vergleich erfolgte die Blutentnahme der gleichen Probanden an einem anderen Tag ohne vorangegangene sportliche Betätigung. Hier zeigt sich eine normale Apoptoseinduktion durch STS. X-Achse: Behandlung der PMN in den verschiedenen wells. Y-Achse: Apoptoserate in %. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

4.3 Der Einfluss von 2,5 bis 10 μM DETA-NO

4.3.1 DETA-NO 2,5 bis 5 μM senkt spontane Apoptose

Da sich der Effekt einer verminderten Apoptose in unserer ersten Versuchsreihe am ehesten im Bereich der niedrigeren, von uns eingesetzten DETA-NO Konzentrationen zeigte, sah unsere zweite Versuchsreihe Experimente mit DETA-NO in Konzentrationen von 2,5 bis 10 μM vor. Hier zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die spontane Apoptose in Konzentrationen von 2,5 μM sowie 5 μM DETA-NO. Zusammenfassend lässt sich sagen, je niedriger die hinzugefügte Konzentration von DETA-NO war, desto geringer zeigte sich die Apoptoserate der PMN und entsprechend signifikanter war das Ergebnis.

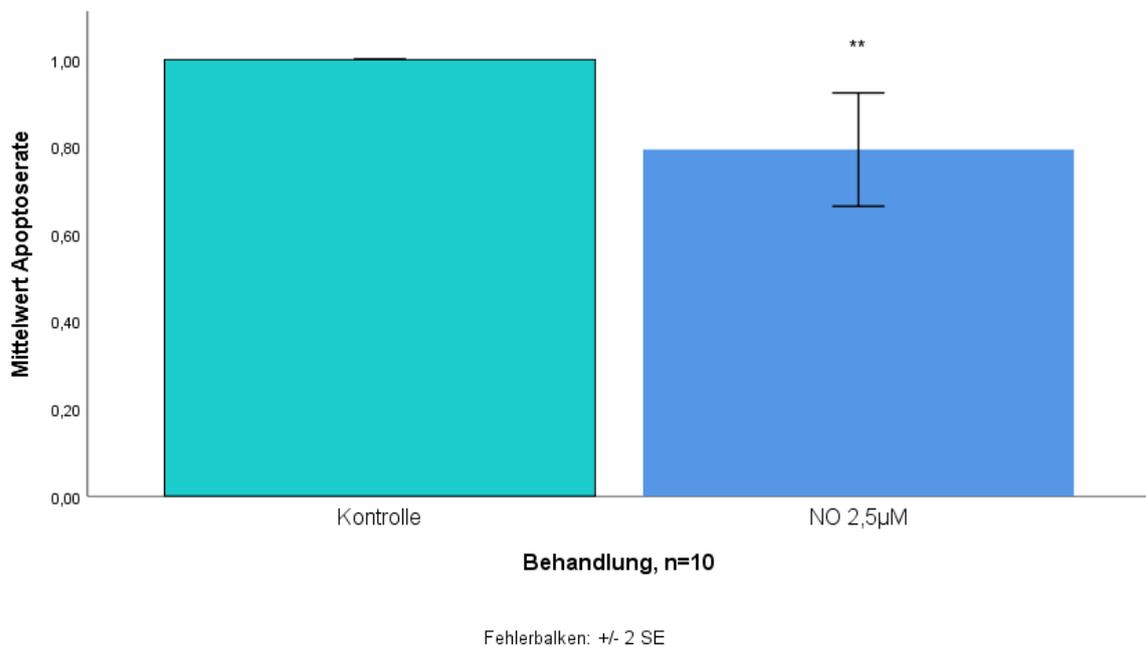


Abb. 15: Der Einfluss von 2,5 μM DETA-NO auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 15 zeigt die spontane Apoptose der mit 2,5 μM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=10$, $F(1(18))=10,081$ $p=.005$

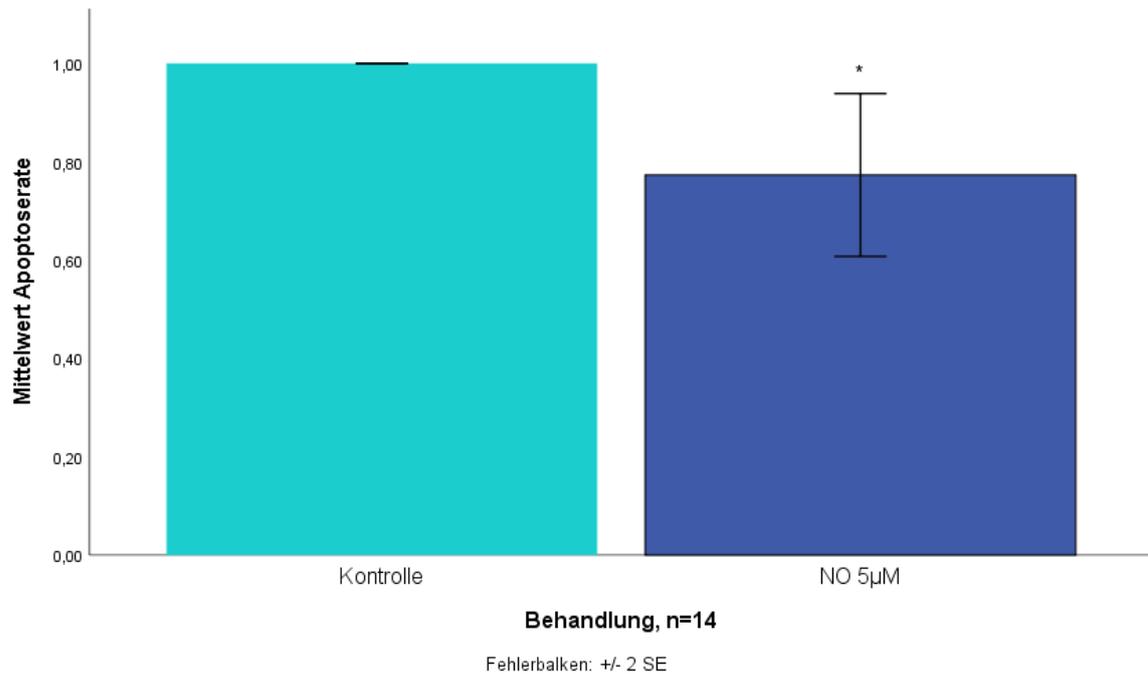


Abb. 16: Der Einfluss von 5 µM DETA-NO auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 16 zeigt die spontane Apoptose der mit 5 µM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=14. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=14, $F(1/26)=7,521$ $p=.011$

4.3.2 DETA NO 2,5 bis 10 µM senkt STS-induzierte Apoptose

Es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Effekt des DETA-NO in Konzentrationen von 2,5 bis 10 µM auf die Staurosporin-induzierte Apoptose.

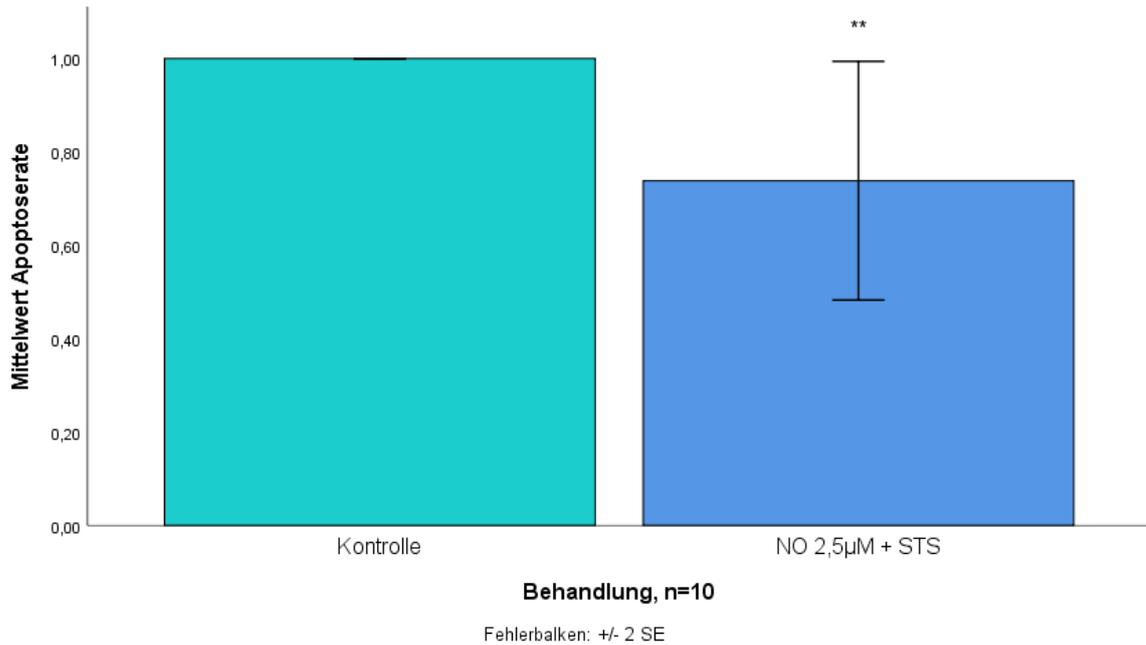


Abb. 17: Der Einfluss von 2,5 µM DETA-NO auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN
Abbildung 17 zeigt die durch STS-induzierte Apoptose der mit 2,5 µM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur mit STS behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, n=10, $F(1/18)=16,766$ p=.001

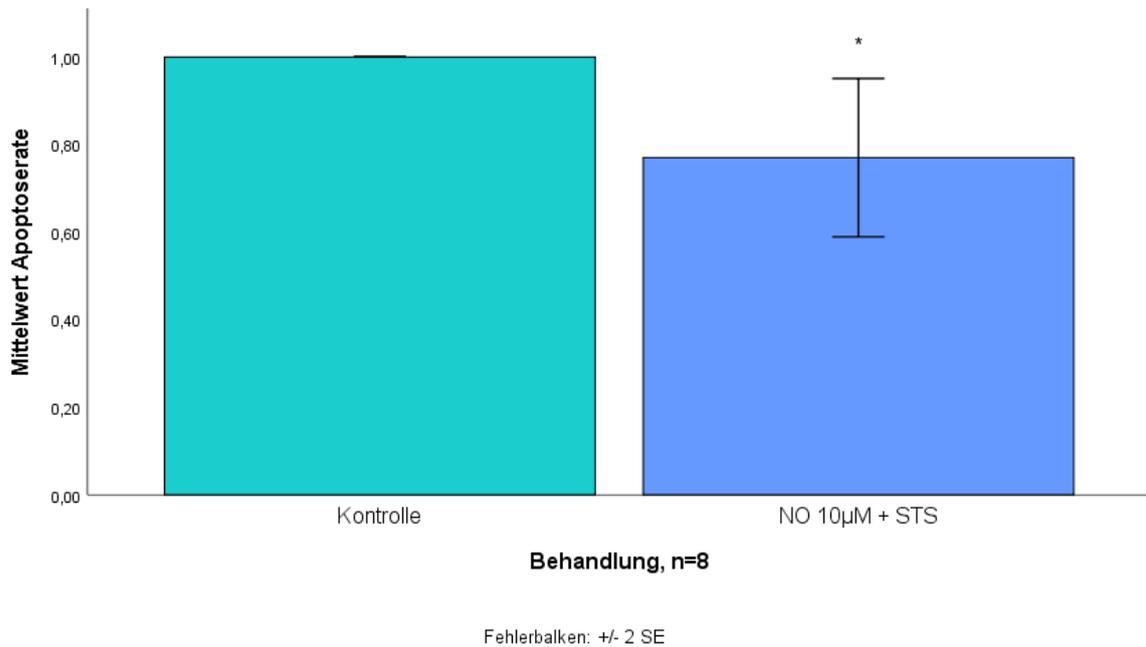


Abb. 18: Der Einfluss von 10 µM DETA-NO auf die durch STS-induzierte Apoptose der PMN
Abbildung 18 zeigt die durch STS-induzierte Apoptose der mit 10 µM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur mit STS behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die jeweilige Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, n=8, $F(1/14)=6,474$ p=.023

4.3.3 Western Blot Analyse des Mcl-1 Proteins

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Mcl-1 Proteinkonzentration mittels Western Blot. Hier zeigte sich trotz reduzierter Apoptose ein Abbau des antiapoptischen Mcl-1. Abbildung 19 und 20 zeigen an zwei Beispielen den Abbau des Mcl-1 Proteins trotz durch DETA-NO gehemmter Apoptose in der *FACS*-Analyse.

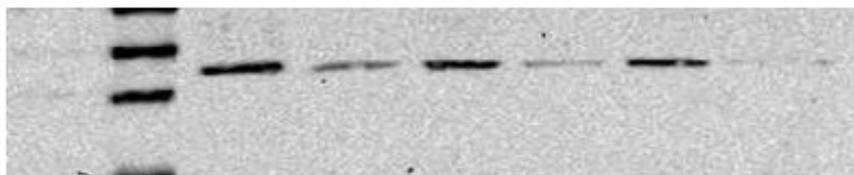
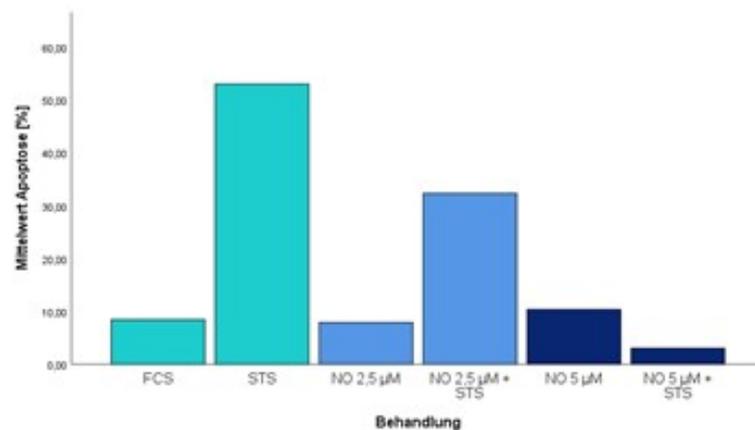


Abb. 19: Western Blot des antiapoptischen Mcl-1 Proteins

Im Western Blot zeigt sich ein Abbau des Mcl-1 Proteins in mit STS behandelten Zellen, obwohl in der begleitend durchgeführten *FACS*-Analyse der PMN eine Inhibierung der STS-induzierten Apoptose durch DETA-NO nachgewiesen werden konnte. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

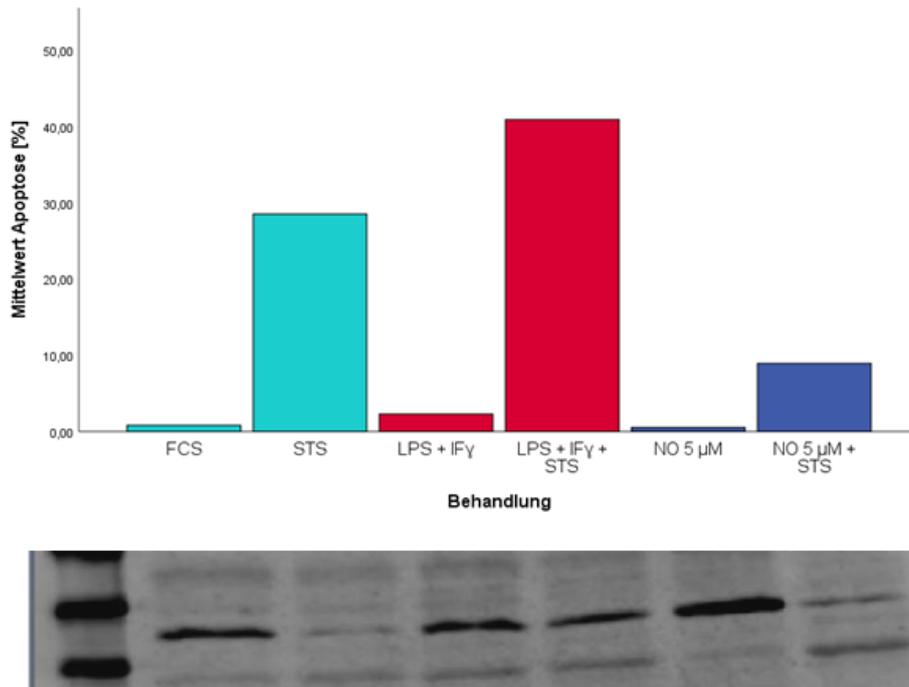


Abb. 20: Western Blot des Mcl-1 Proteins aus neutrophilen Granulozyten

Auch in diesem Western Blot kommt es zu einem Abbau des antiapoptotischen Mcl-1 in mit DETA-NO sowie STS behandelten Zellen trotz in der FACS-Analyse nachgewiesener Inhibierung der STS-induzierten Apoptose. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.

4.4 IF γ und LPS senken die neutrophile Apoptose

IF γ und LPS sind wichtige Mediatoren der Inflammation und omnipräsent im Rahmen von septischen Geschehen. Für die folgende Versuchsreihe wurde IF γ in Konzentrationen von 250 units pro *well* eingesetzt. LPS wurde in Konzentrationen von 100 ng/ml verwendet. Hierdurch simulierten wir eine Entzündungsreaktion, welche zu einer Präaktivierung der Neutrophilen und gleichzeitig über eine Aktivierung der iNOS zu einer erhöhten NO-Konzentration führen sollte. Es ist bekannt, dass iNOS exprimierende Zellen *in vitro* NO bis zu einer Konzentration von 5 μ M für 24 Stunden oder länger produzieren (Laurent, Lepoivre et al. 1996).

4.4.1 Ihr Einfluss auf die spontane Apoptose

Die spontane Apoptose der neutrophilen Granulozyten wird durch Hinzugabe von IF γ in Kombination mit LPS signifikant gesenkt ($F(1,12)=32,861$ $p < .001$).

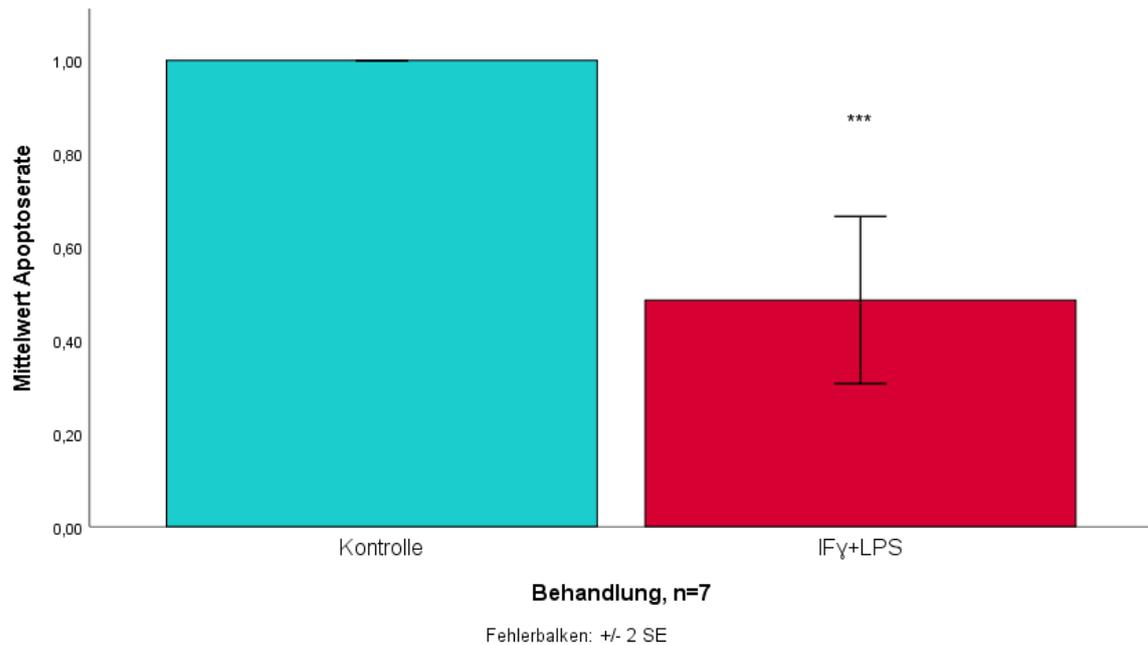


Abb. 21: Der Einfluss von IF γ und LPS auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 21 zeigt die spontane Apoptose von mit IF γ und LPS behandelten Neutrophilen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Hierbei ist die Apoptoserate der Kontrolle auf 1 gesetzt. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, n=7; $F(1,12)=32,861$ p < .001

4.4.2 Ihr Einfluss auf die STS-induzierte Apoptose

Auch die durch Staurosporin induzierte Apoptose wird durch den Einfluss von LPS in Kombination mit IF γ ebenfalls signifikant gesenkt ($F(1/10)=6,496$ p = .029).

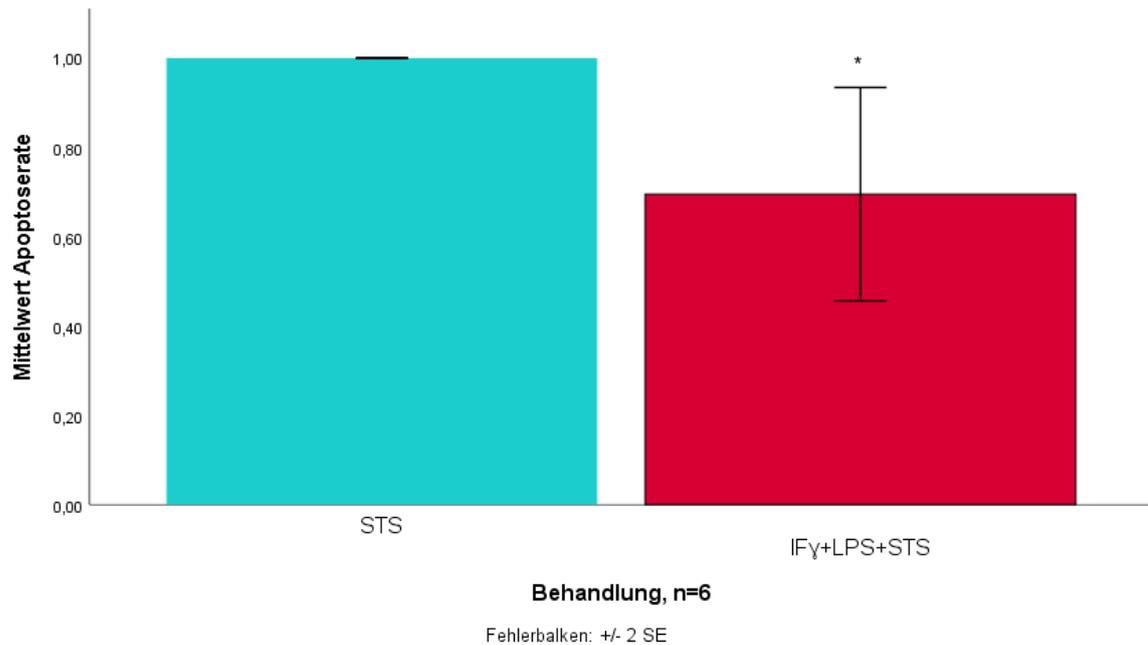


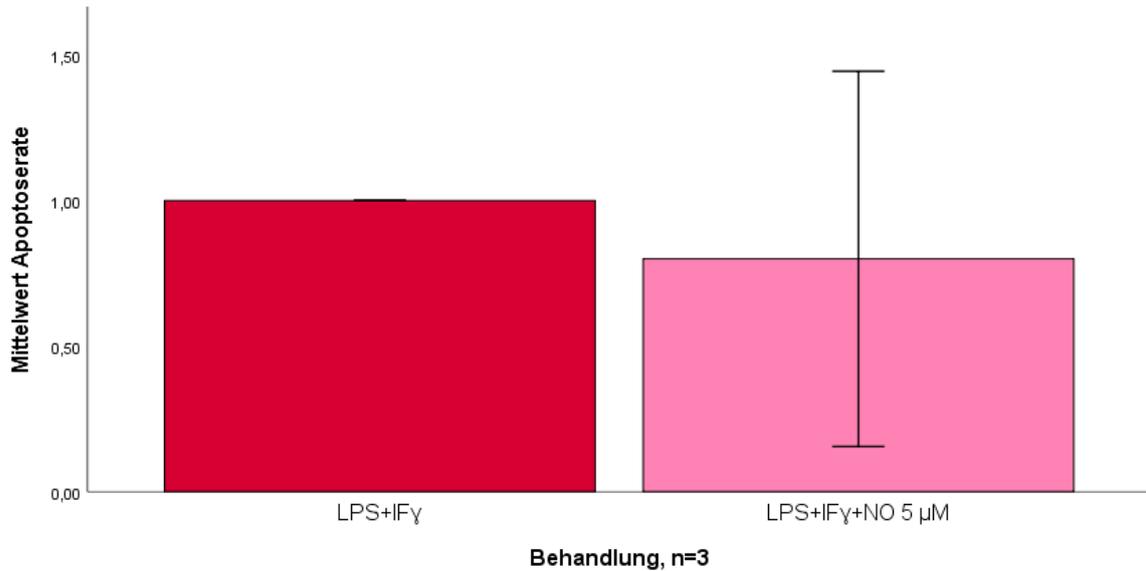
Abb. 22: Der Einfluss von IF γ und LPS auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN

Abbildung 22 zeigt die durch STS- induzierte Apoptose von mit IF γ und LPS behandelten Neutrophilen im Vergleich zur mit STS-behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Hierbei ist die Apoptoserate der Kontrolle auf 1 gesetzt. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, n= 6, $F(1/10)=6,496$ p=.029

Die spontane Apoptose der PMN konnte durch die Behandlung deutlich reduziert werden, aber auch die Wirkung des Apoptoseinduktors STS wurde aufgehoben und die Zellen zeigten ebenfalls eine signifikant geringere induzierte Apoptose als unbehandelte Kontrollzellen.

4.5 Der Einfluss von DETA-NO auf die Apoptose von mit IF γ und LPS behandelten PMN

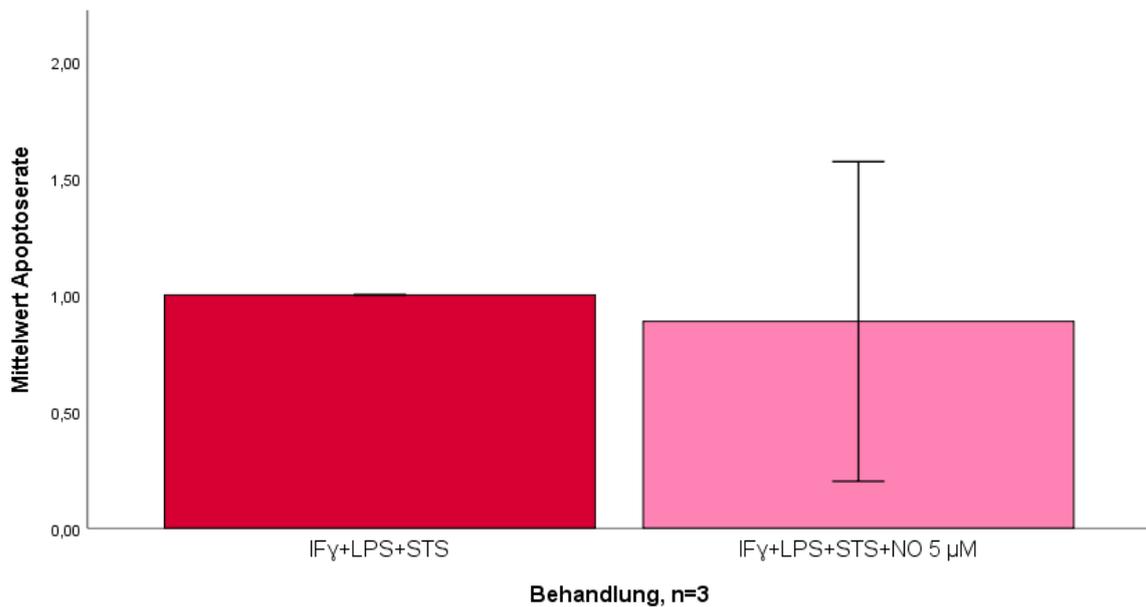
Wir untersuchten daraufhin, ob eine Kombination aus proinflammatorischen Zytokinen mit zusätzlich zugeführtem DETA-NO eine weitere Reduktion der neutrophilen Apoptose bewirken konnte. Mit diesen Versuchen untersuchten wir, ob die Kombination einer erhöhten intrazellulären NO-Konzentration mit einer externen NO-Quelle einen zusätzlichen Einfluss auf die Apoptose der Zellen nehmen konnte. Hierzu wurde Zellen zusätzlich zu LPS und IF γ , in den oben bereits eingesetzten Konzentrationen, DETA-NO in einer Konzentration von 5 μ M zugesetzt. Als Kontrolle wurden nur mit LPS in Kombination mit IF γ behandelte Zellen verwendet. Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss des DETA-NO auf die Apoptoserate der Neutrophilen. Weder die spontane noch die Staurosporin-induzierte Apoptose konnten signifikant beeinflusst werden.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 23: Der Einfluss von DETA-NO 5 µM auf die Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN

Abbildung 23 zeigt die spontane Apoptose der zusätzlich mit 5 µM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur nur mit IFγ und LPS behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Hierbei ist die Apoptoserate der Kontrolle auf 1 gesetzt. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=3, $F(1/4)=0,385$ p=.569



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 24: Der Einfluss von DETA-NO 5 µM auf die durch STS induzierte Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN

Abbildung 24 zeigt die durch STS-induzierte Apoptose der mit zusätzlich mit 5 µM DETA-NO behandelten PMN im Vergleich zur induzierten Apoptose der nur mit IFγ und LPS behandelten PMN. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=3, $F(1/4)=0,109$ p=.757

4.6 Der Einfluss von L-NIO

Bei L-NIO handelt es sich um einen nicht-selektiven Inhibitor aller NOS-Isoformen. Wir überprüften, ob durch Inhibierung der NOS bei mit proinflammatorischen Zytokinen behandelten Zellen die induzierte Apoptose im Vergleich zu nicht mit L-NIO behandelten Proben anstieg, da die Zellen nicht mehr in der Lage waren, NO zu produzieren. Hierzu wurden 250 μ M L-NIO dihydrochloride pro *well* eingesetzt. Statt eines Anstiegs der Apoptoserate zeigte sich jedoch eine weitere Reduktion der durch Staurosporin induzierten Apoptose nach Einsatz von L-NIO, welche jedoch nicht signifikant war ($n=9$, $F=(1/16)=3,785$ $p=.07$).

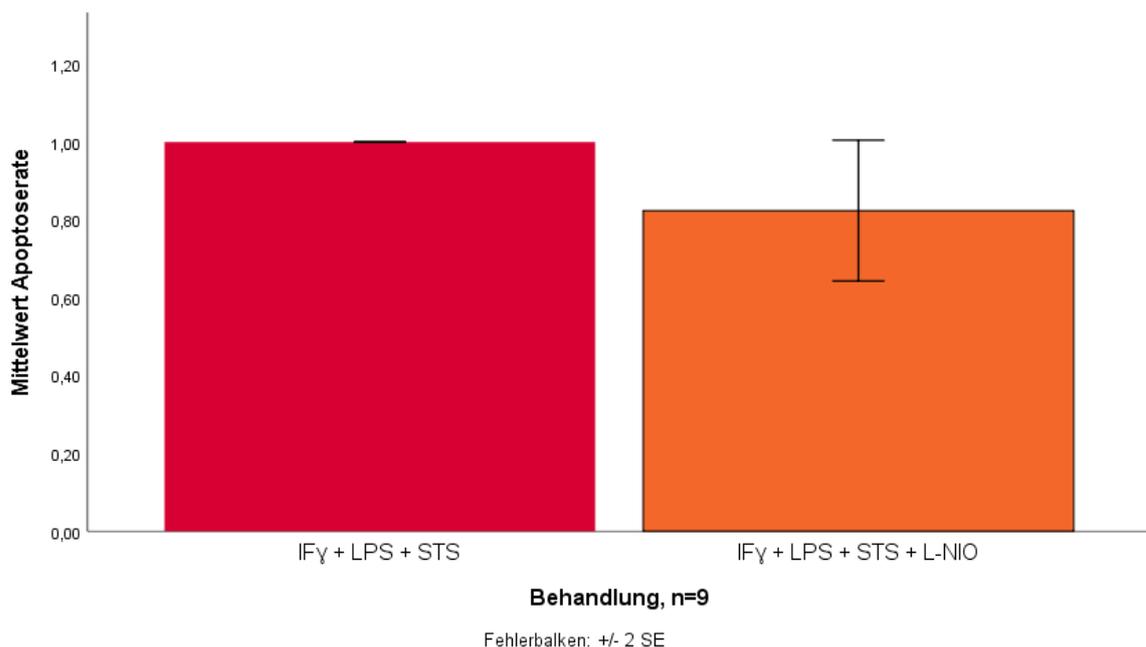
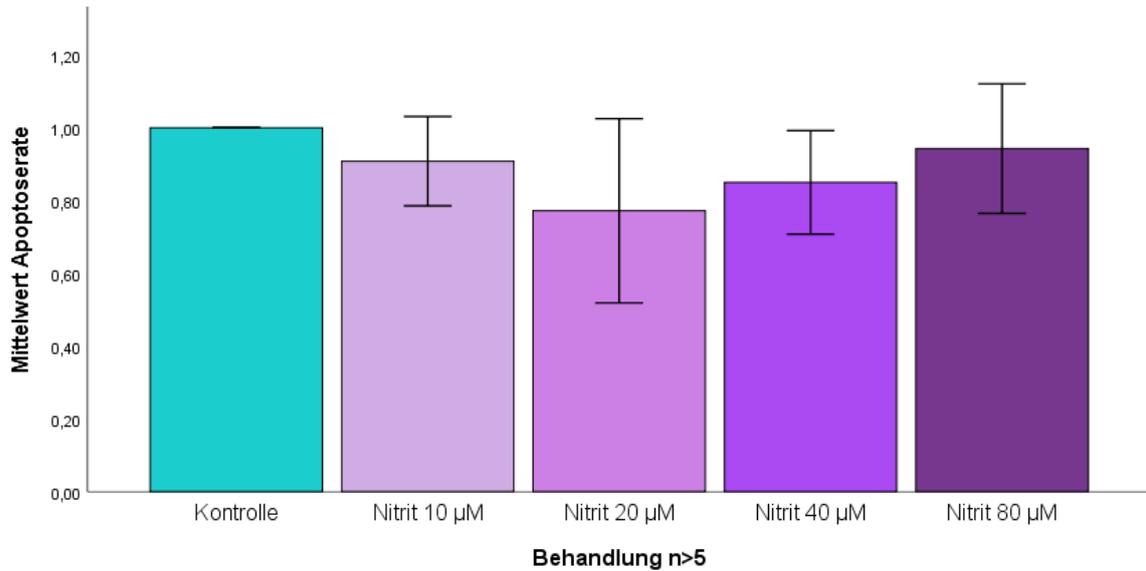


Abb. 25: Der Einfluss von L-NIO auf die induzierte Apoptose von mit IF γ und LPS behandelten PMN
Abbildung 25 zeigt den Einfluss von L-NIO auf die induzierte Apoptose von mit IF γ und LPS behandelten PMN. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, $n=9$ $F(1/16)=3,785$ $p=.07$

4.7 Der Einfluss von Nitrit auf das neutrophile Apoptoseverhalten

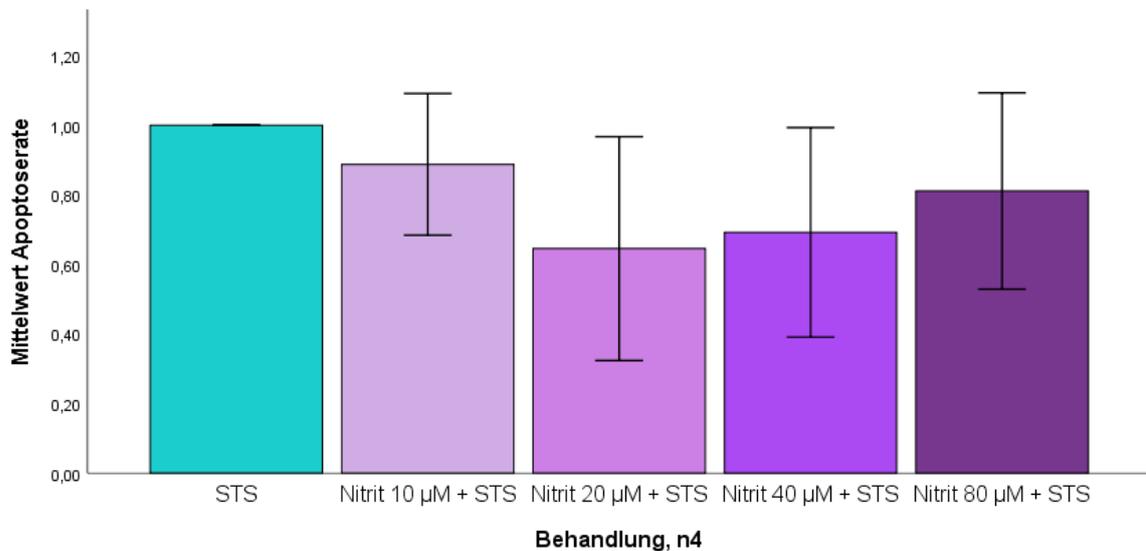
Da Nitrit neben Nitrat eines der wichtigsten Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids ist, untersuchten wir zusätzlich den Einfluss von Nitrit auf die neutrophile Apoptose, um zu differenzieren, ob es sich bei den zuvor beobachteten Effekten des DETA-NO tatsächlich um einen Einfluss durch Stickstoffmonoxid handelte oder, ob dieser eventuell durch sein Abbauprodukt entstand. Hierzu setzten wir Nitrit in Konzentrationen von zehn bis 80 μ M ein. Auch hier wurde der Effekt sowohl für die spontane Apoptose der Neutrophilen als auch für die durch Staurosporin induzierte Apoptose untersucht. Abbildung 26 und 27 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 26: Der Einfluss von Nitrit (10- 80 µM) auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 26 zeigt die spontane Apoptose der mit Nitrit behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n>5, $F(4/28)=1,504$ $p=.228$



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 27: Der Einfluss von Nitrit (10- 80 µM) auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN

Abbildung 27 zeigt die durch STS-induzierte Apoptose von mit Nitrit behandelten PMN im Vergleich zur mit STS behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der Neutrophilen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: Doppelter Standardfehler, n=4, $F(4/23)=1,760$, $p=.171$

Hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Nitrits auf die spontane Apoptose ($F(4/28)=1,504$, $p=.228$). Auch die induzierte Apoptose zeigte sich durch Nitrit nicht signifikant beeinflusst

($F(4/23)=1,760$, $p=.171$). Somit schlussfolgerten wir, dass die zuvor gesehenen Einflüsse durch Stickstoffmonoxid selbst und nicht durch sein Abbauprodukt vermittelt wurden.

4.8 HL-60 Zellen

Die humane myeloide Leukämie-Zelllinie (HL-60) diente nach Ausdifferenzierung mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) als Modell für neutrophile Granulozyten. Wir führten folglich alle mit neutrophilen Granulozyten durchgeführten Experimente ebenfalls mit ausdifferenzierten HL-60 Zellen durch. Hier zeigte sich, dass die Apoptose der neutrophil-ähnlichen HL-60 Zellen, weder durch NO oder sein Abbauprodukt Nitrit noch durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden konnte. Sowohl die spontane als auch die induzierte Apoptose zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt.

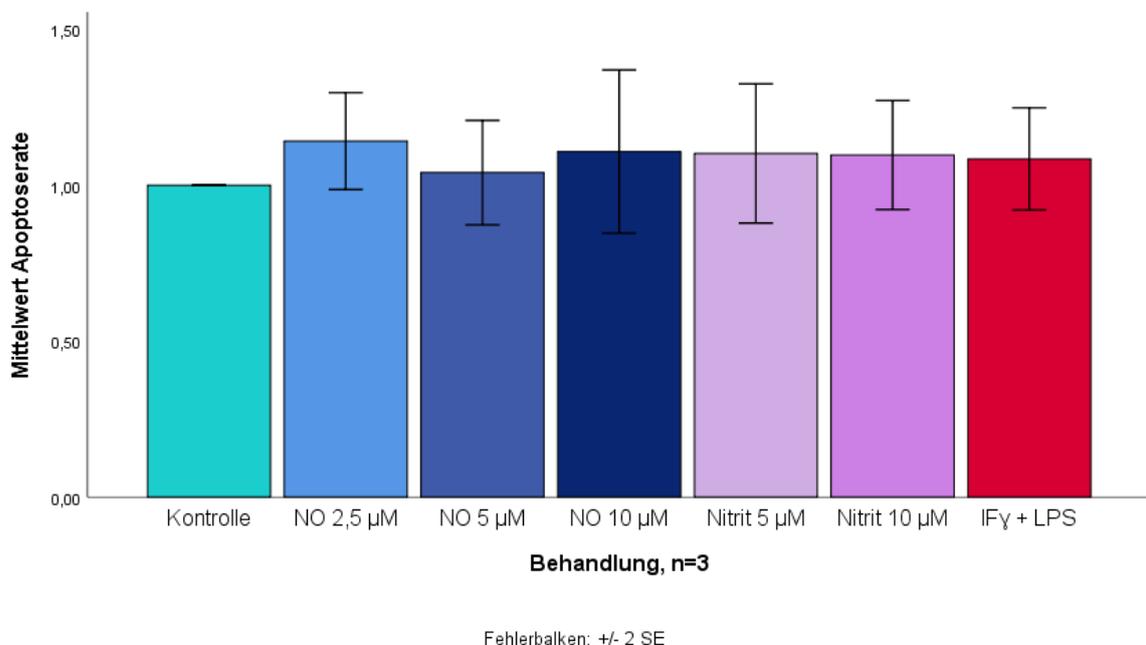
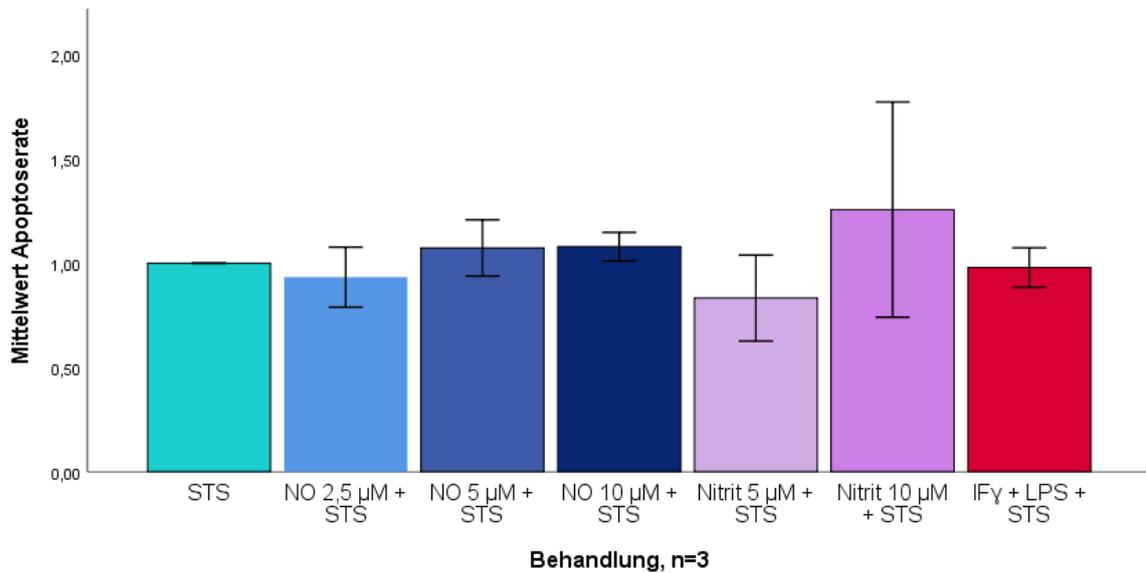


Abb. 28: Die spontane Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen
Abbildung 28 zeigt die spontane Apoptose der neutrophil-ähnlichen Zellen nach entsprechender Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der HL-60 Zellen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=3$, $F(6,14)=0,272$, $p=.941$

Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen eingesetzten Reagenzien auf die spontane Apoptose der HL-60 Zellen ($F(6,14)=0,272$, $p=.941$).



Fehlerbalken: +/- 2 SE

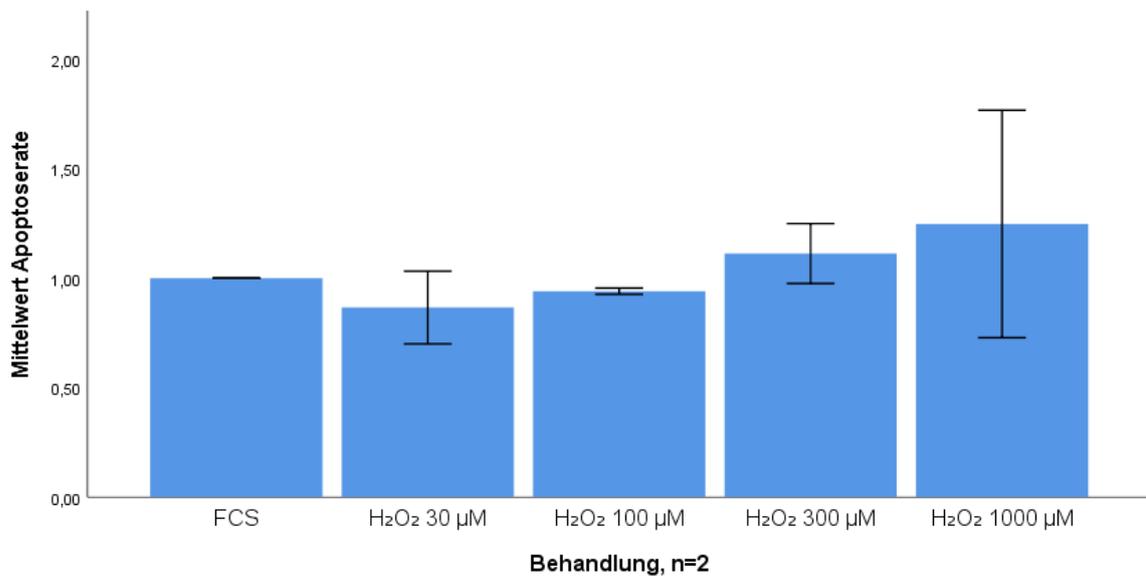
Abb. 29: Die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL 60 Zellen nach entsprechender Behandlung

Abbildung 29 zeigt die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen nach entsprechender Behandlung im Vergleich zur mit STS behandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der HL-60 Zellen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=3$, $F(6,14)=1,38$, $p=.287$

Es zeigte sich ebenso kein signifikanter Einfluss der verschiedenen eingesetzten Reagenzien auf die durch STS induzierte Apoptose der HL-60 Zellen $F(6,14)=1,38$, $p=.287$.

4.8.1 HL-60 Zellen und H_2O_2

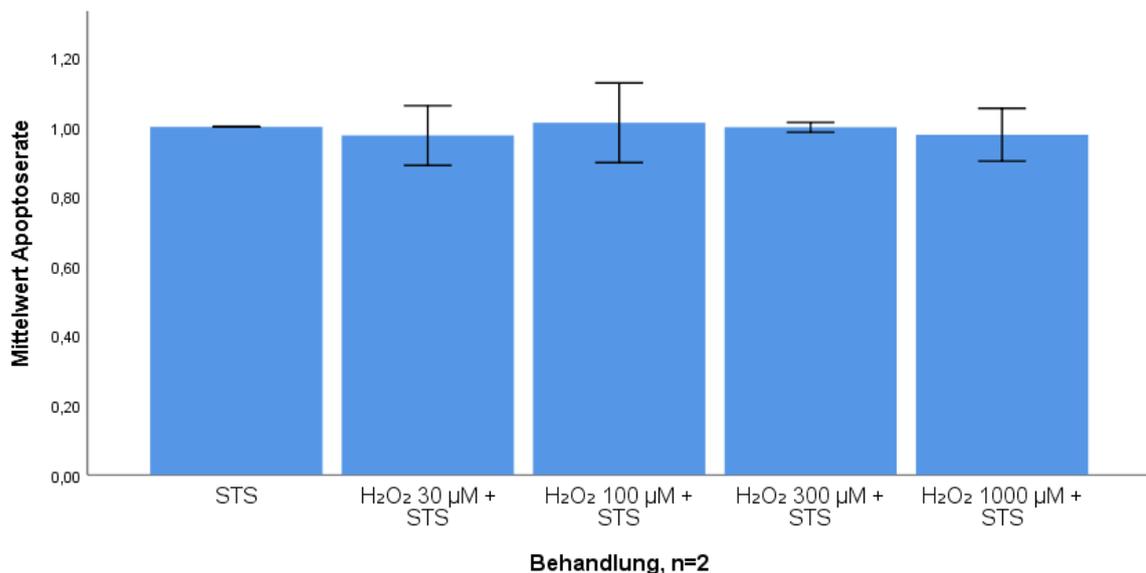
Da die HL-60 Zellen im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Neutrophilen keine signifikanten Veränderungen ihrer Apoptoseraten durch die verschiedenen Behandlungen zeigten, schlussfolgerten wir, dass weitere Faktoren Einfluss auf die Apoptoserate nehmen müssen und die Reduktion der neutrophilen Apoptose eine Kombination dieser und unserer zugefügten Substanzen ist. Wir versuchten nun in nachfolgenden Experimenten, bei den mit ATRA behandelten HL-60 Zellen zusätzlichen oxidativen Stress durch ein Hinzugeben von H_2O_2 auszulösen. Es folgten Untersuchungen der spontanen sowie der STS-induzierten Apoptose dieser Zellen nach Zugabe von 30 bis 1000 μM H_2O_2 . Hier ließ sich jedoch ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der Apoptose feststellen. Abbildung 30 und 31 zeigen die Ergebnisse.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 30: Der Einfluss von H₂O₂ auf die spontane Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen

Abbildung 30 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von H₂O₂ auf die spontane Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen differenzierten HL-60 Zellen. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der HL-60 Zellen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=2, $F(4/5)=1,422$ p=.349. FCS = unbehandelte Kontrolle, welche nur fetales Kälberserum (FCS) enthält.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 31: Der Einfluss von H₂O₂ auf die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen

Abbildung 31 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von H₂O₂ auf die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung der HL-60 Zellen in den verschiedenen *wells*. Auf der Y-Achse

ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=2$, $F(4/5)=0,190$ $p=.934$

4.9 PMN und gasförmiges Stickstoffmonoxid

In unserer letzten Versuchsreihe sahen wir Experimente mit einer anderen NO-Quelle als DETA-NO vor. Hierzu wurden NO-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt, aus welchen das NO durch eine permeable Membran zu den PMN in den darüber liegenden *wells* diffundierte. Wir verwendeten eine 24 *well* Platte „*Imaging Plate FC*“ der Firma Zell-Kontakt GmbH (Nörten-Hardenberg, Deutschland). In Vorversuchen wurde mittels CLD-Messung die NO-Konzentration in den *wells* bestimmt. Hierzu wurden jeweils acht *wells* mit Medium gefüllt und anschließend mit einer entsprechend konzentrierten NO-Lösung inkubiert. Es erfolgten CLD-Messungen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte die Messung aus acht verschiedenen *wells*. Zunächst untersuchten wir die Konzentration in den *wells*, welche beim Einsatz einer Lösung mit 1 % NO entsteht. Hier zeigte sich in der CLD-Messung eine innerhalb der ersten Stunde konstant steigende NO-Konzentration von zuletzt ca. 80 ppb in den *wells* (Abbildung 32).

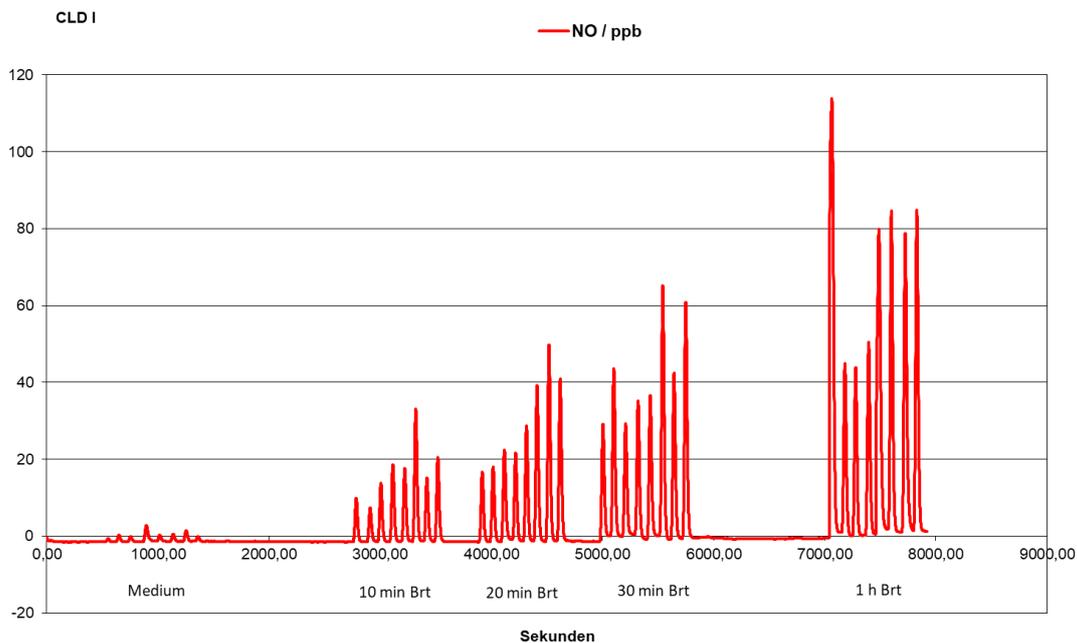


Abb. 32: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 1%iger NO-Lösung

Abbildung 32 zeigt die in den *wells* gemessene NO-Konzentration nach Inkubation mit 1%iger NO-Lösung nach zehn, 20, 30 sowie 60 Minuten im Brutschrank (Brt). Zum Vergleich erfolgte eine Messung der NO-Konzentration im unbehandelten Medium (ganz links aufgetragen). X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

Nach Inkubation für insgesamt 18 Stunden schlossen wir eine Messung aller Nitroverbindungen an. Hier zeigten sich Konzentrationen außerhalb des Messbereichs des Gerätes, sodass die Proben 1:10 mit NaCl verdünnt werden mussten. Die Konzentrationen lagen bei ca. 4000 ppb.

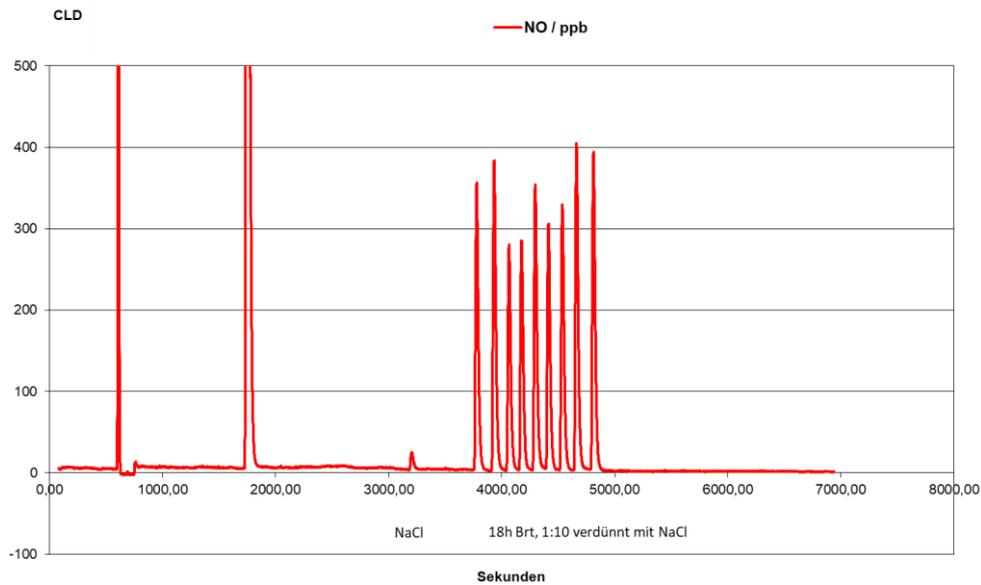


Abb. 33: CLD Messung aller Nitroverbindungen nach 18-stündiger Inkubation mit 1 %iger NO-Lösung
Abbildung 33 zeigt die in den *wells* gemessene Konzentration an Nitroverbindungen nach Inkubation mit 1 %iger NO-Lösung nach 18 h im Brutschrank (Brt). Die Proben mussten vor der Messung 1:10 mit NaCl verdünnt werden. Außerdem erfolgte eine Messung von NaCl. X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

Wir schlussfolgerten, dass eine 1 %ige NO-Lösung zu hoch konzentriert war und für die Behandlung von PMN aufgrund von Toxizität nicht geeignet. Nachfolgend erfolgten Messungen einer 0,1 sowie 0,01 %igen NO-Lösung. Abbildung 34 zeigt die NO-Konzentration in den *wells* nach Behandlung mit 0,1 %iger NO-Lösung. Hier sahen wir eine Konzentration von 2 bis 12 ppb.

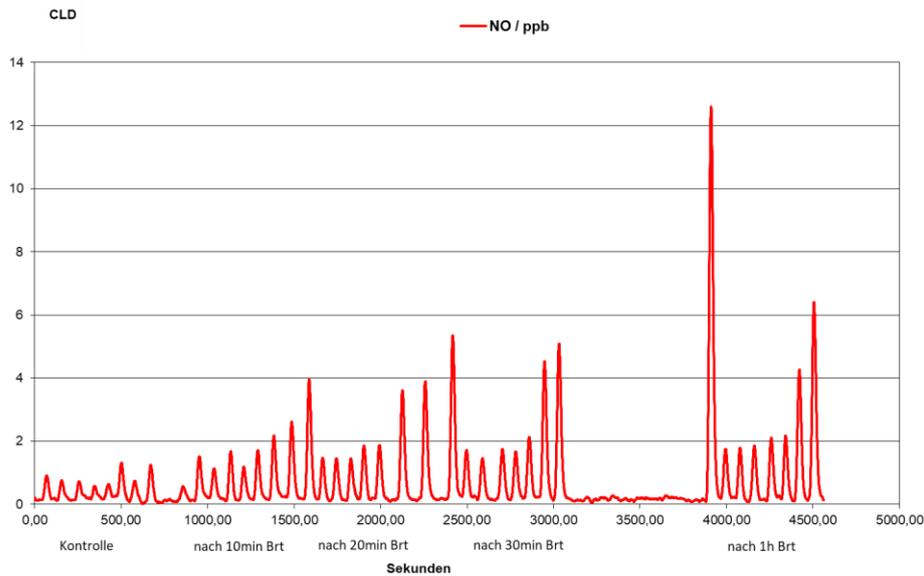


Abb. 34: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 0,1 %iger NO-Lösung

Abbildung 34 zeigt die in den *wells* gemessene NO-Konzentration nach Inkubation mit 0,1 %iger NO-Lösung nach zehn, 20, 30 sowie 60 Minuten im Brutschrank (Brt). Zum Vergleich erfolgte eine Messung der NO-Konzentration im unbehandelten Medium (ganz links aufgetragen). X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

Die Abbildungen 35 bis 37 zeigen die NO-Konzentrationen bei 0,01 %iger NO-Lösung. Hier zeigte sich innerhalb der ersten 30 Minuten ein Anstieg auf bis zu 30 ppb. Nach vier Stunden Inkubation lag die Konzentration in den *wells* bei 1-8 ppb. Nach 18-stündiger Inkubation zeigte sich eine Konzentration zwischen 5 – 23 ppb.

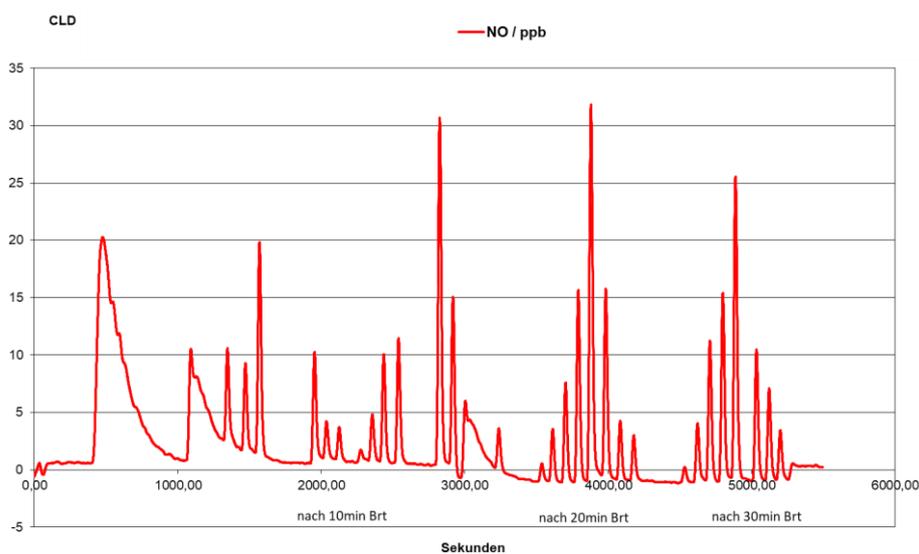


Abb. 35: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 0,01 %iger NO-Lösung

Abbildung 35 zeigt die in den *wells* gemessene NO-Konzentration nach Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung nach zehn, 20 sowie nach 30 Minuten im Brutschrank (Brt). X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

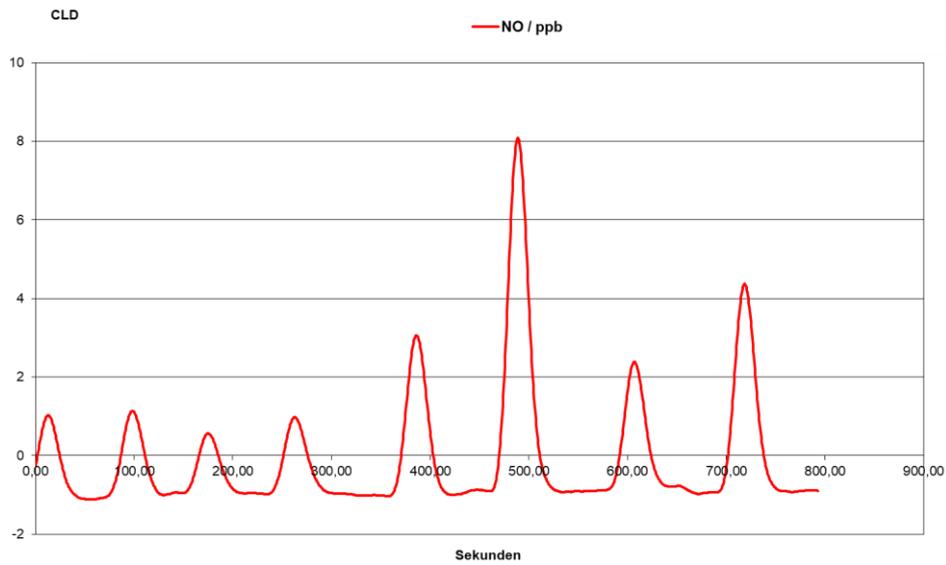


Abb. 36: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] nach 4 h Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung
 Abbildung 36 zeigt die in den *wells* gemessene NO-Konzentration nach vierstündiger Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung im Brutschrank. X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

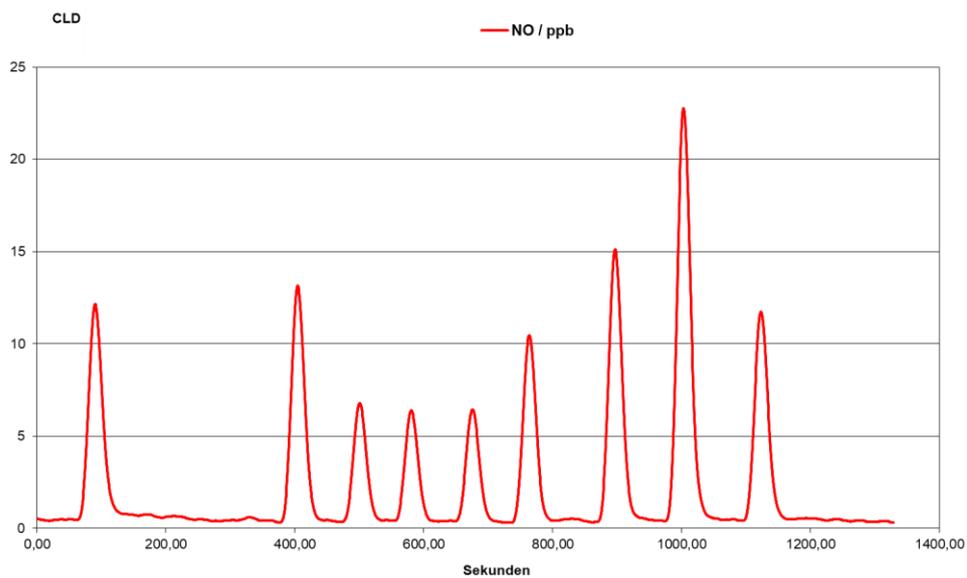


Abb. 37: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] nach 18 h Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung
 Abbildung 37 zeigt die in den *wells* gemessene NO-Konzentration nach 18-stündiger Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung im Brutschrank. X-Achse: Zeit in Sekunden. Y-Achse: NO-Konzentration in ppb.

Für die nachfolgenden Experimente verwendeten wir NO-Lösungen der Konzentrationen von 0,1 % sowie 0,01 %.

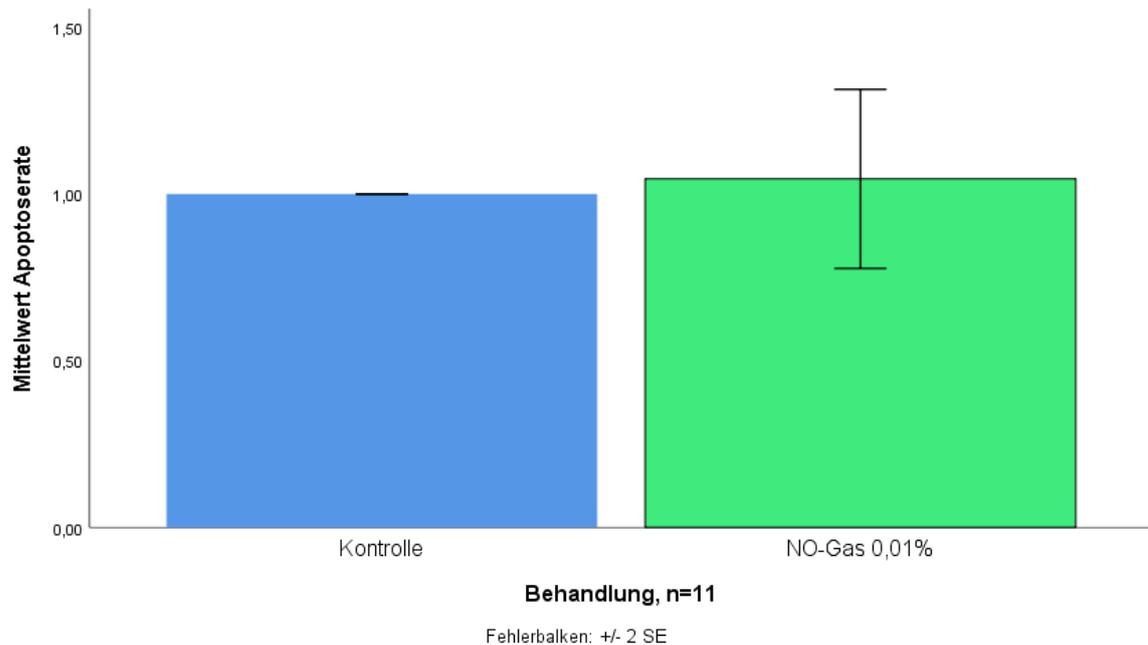


Abb. 38: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 38 zeigt die spontane Apoptose der mit 0,01 %igem NO-haltigen Gas behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=11, $F(1/18)=0,112$ $p=.741$

Alle Versuche zusammengenommen sahen wir keinen signifikanten Einfluss des Stickstoffmonoxids auf das Apoptoseverhalten der PMN bei einer eingesetzten Konzentration von 0,01 % NO. Es zeigte sich jedoch, dass ein Teil der PMN eine Resistenz gegen den intrinsischen Apoptoseinduktor Staurosporin aufwies. Teilt man die PMN nun in eine STS-resistente sowie eine nicht-STs resistente Gruppe, so fällt auf, dass PMN, welche eine STS-Resistenz zeigten, eine deutlich erhöhte spontane Apoptose nach Behandlung mit NO zeigten. Andererseits begingen PMN ohne STS-Resistenz in signifikantem Maße eine reduzierte spontane Apoptose nach Zugabe von NO. Abbildung 39 zeigt die PMN, welche keine Staurosporin-Resistenz aufwiesen. Hier sieht man eine signifikante Reduktion der spontanen Apoptose nach Zugabe von NO. Abbildung 40 hingegen zeigt die Ergebnisse der PMN, welche eine gestörte induzierte intrinsische Apoptose nach Behandlung mit Staurosporin aufwiesen. Hier zeigt sich eine Erhöhung der spontanen Apoptose nach Zugabe von NO, welche jedoch nicht signifikant ist.

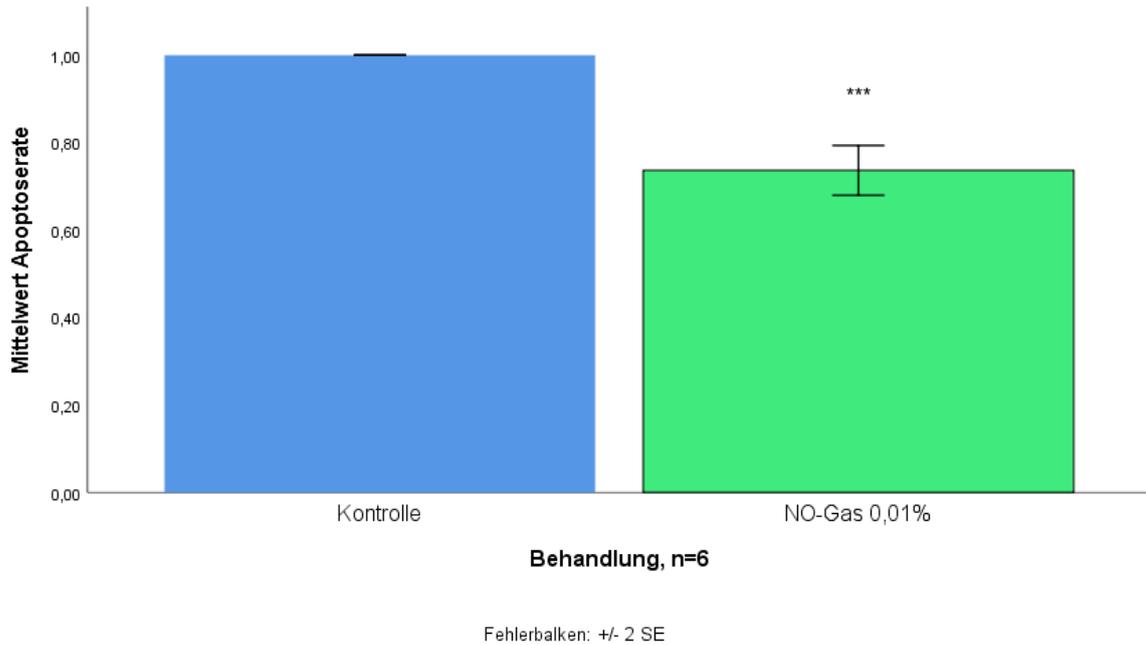


Abb. 39: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose nicht-ST2 resistenter PMN

Abbildung 39 zeigt die spontane Apoptose der mit 0,01 %igem NO-haltigen Gas behandelten nicht-ST2-resistenten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=6, $F(1/10)=85,493$ $p<.001$

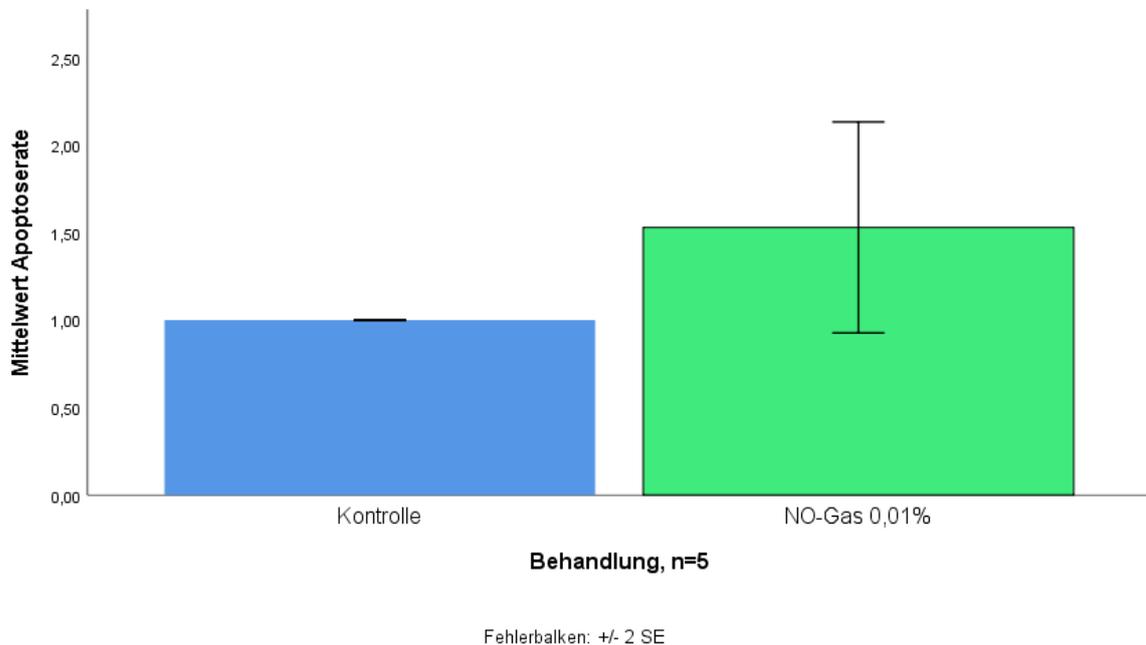
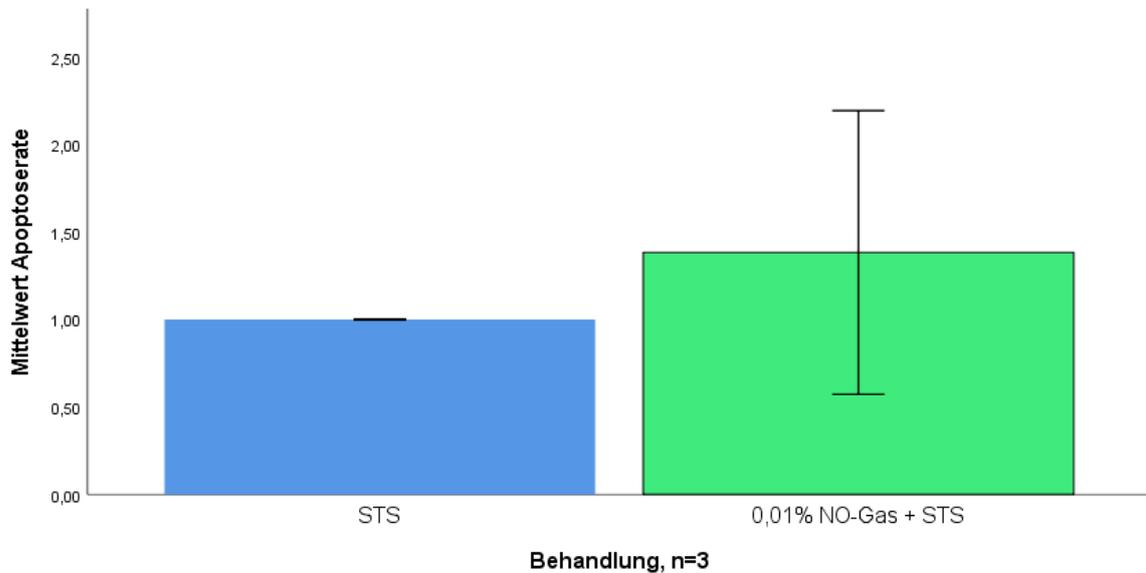


Abb. 40: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose ST2-resistenter PMN

Abbildung 40 zeigt die spontane Apoptose der mit 0,01 %igem NO-haltigen Gas behandelten ST2-resistenten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, n=5, $F(1/8)=4,901$ $p=.058$

Auf die Staurosporin-induzierte Apoptose nimmt das Stickstoffmonoxid in dieser Form jedoch keinen Einfluss.

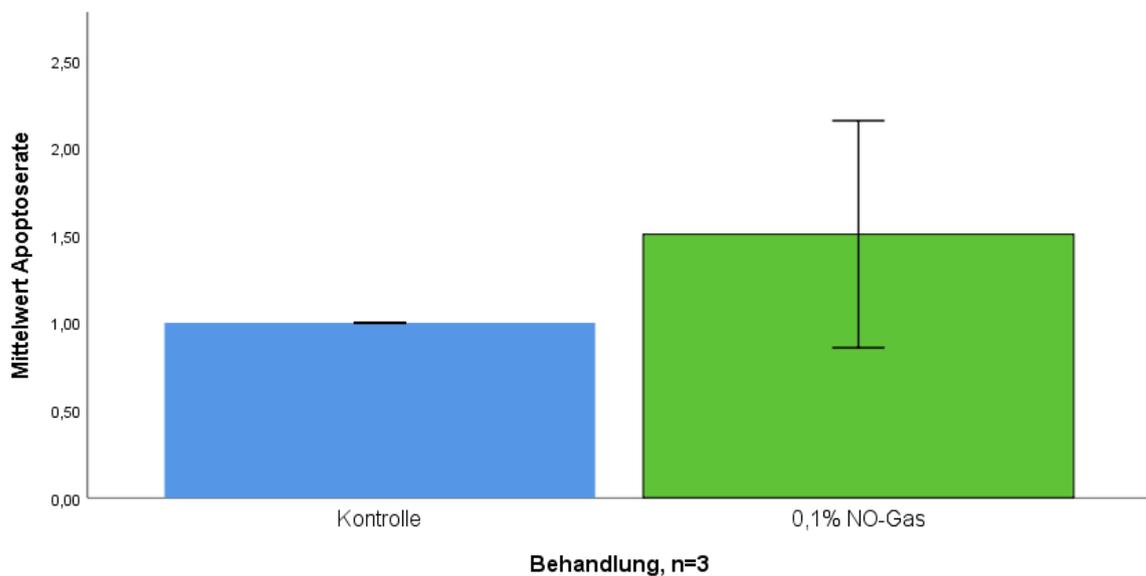


Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 41: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN

Abbildung 41 zeigt die STS-induzierte Apoptose der mit 0,01 %igem NO-haltigen Gas behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=3$, $F(1/4)=0,894$ $p=.398$

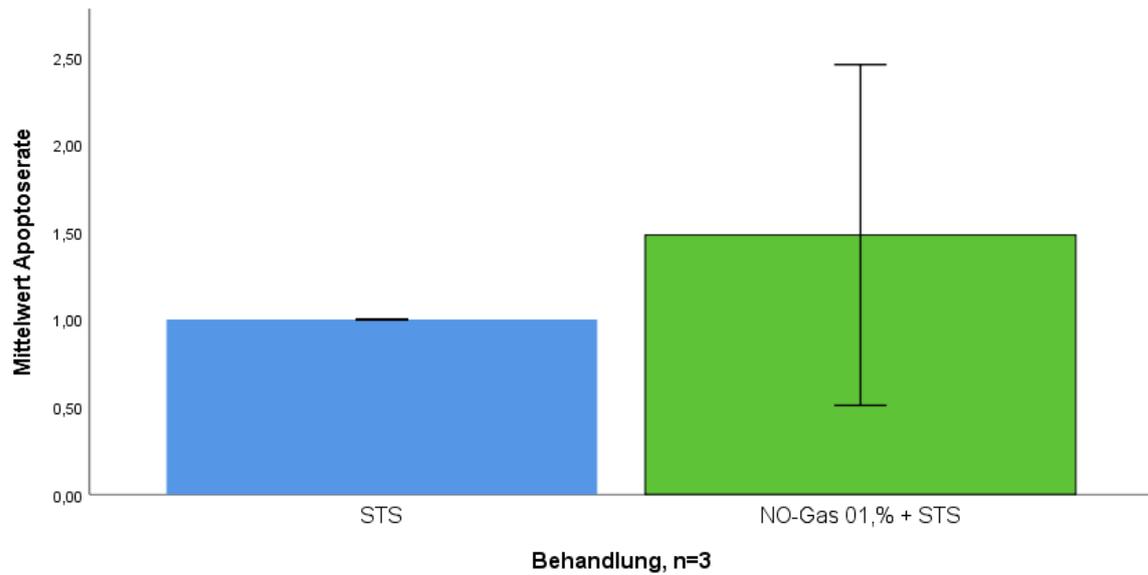
Zu guter Letzt untersuchten wir den Einfluss von Stickstoffmonoxid in höherer Konzentration (0,1 % NO). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der spontanen Apoptoserate der Neutrophilen.



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 42: Der Einfluss von 0,1 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose der PMN

Abbildung 42 zeigt die spontane Apoptose der mit 0,1 %igem NO-haltigen Gas behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=3$, $F(1/4)=2,438$ $p=.193$



Fehlerbalken: +/- 2 SE

Abb. 43: Der Einfluss von 0,1 %igem NO-Gas auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN

Abbildung 43 zeigt die STS-induzierte Apoptose der mit 0,1 %igem NO-haltigen Gas behandelten PMN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auf der X-Achse aufgetragen befindet sich die unterschiedliche Behandlung. Auf der Y-Achse ist die Apoptoserate als relativer Mittelwert aufgetragen. Fehlerbalken: doppelter Standardfehler, $n=3$, $F(1/4)=0,984$ $p=.377$

5. Diskussion

Die Sepsis ist auch heutzutage trotz stetigen medizinischen Fortschritts und intensiver Forschung mit einer hohen Letalität assoziiert. Die Gesamtsterblichkeit liegt bei 40-60 %. Kommt es zum septischen Schock oder septischen Organversagen steigt diese noch weiter an (Bone, Fisher et al. 1989, Parrillo 1993). Auf deutschen Intensivstationen lag die Prävalenz der Sepsis laut einer Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis von 2007 bei 11 %. Die 90-Tage-Mortalität wird hier mit 54 % angegeben (Engel, Brunkhorst et al. 2007). Eine Studie aus den Vereinigten Staaten konnte zeigen, dass dort im Zeitraum von 1979 bis 2000 die Inzidenz der Sepsis und auch die Sepsis-assoziierten Todesfälle jährlich um 8,7 % stiegen (Martin, Mannino et al. 2003). Neue Erkenntnisse und zusätzliche Therapiestrategien wären wünschenswert, um in Zukunft durch eine verbesserte Therapie eine Verringerung der Letalität erreichen zu können.

Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten eine essentielle Rolle bei der primären Immunabwehr spielen (Edwards 1994). Bei ihnen handelt es sich um ausdifferenzierte, nicht proliferierende Zellen mit kurzer Lebensdauer (Bainton, Ulliyot et al. 1971). Natürlicher Weise begehen sie nach acht bis 20 Stunden spontane Apoptose (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Bei Entzündungsreaktionen kann ihre Lebensspanne jedoch deutlich verlängert sein (Taneja, Parodo et al. 2004). Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr werden sie als erste Zellen zum Entzündungsgeschehen rekrutiert (Vedder, Fouty et al. 1989). Sie töten eindringende Mikroorganismen durch Phagozytose, Degranulation und *oxidative Burst* (Nathan 2006). Hierzu ist jedoch die Migration der Neutrophilen zum Infektfokus eine wichtige Voraussetzung (Galkina, Golenkina et al. 2019). Andererseits ist auch eine schnelle zielgerichtete Apoptose wichtig für eine effektive Immunantwort. Denn durch eine verzögerte Apoptose kann es zu einer überschießenden Immunreaktion mit nachfolgendem Gewebeschaden und einer weiteren Aufrechterhaltung der Entzündungssituation kommen (Kurosaka, Watanabe et al. 1998, Fadok, Bratton et al. 2001). Auch chronische Entzündungen können so entstehen (Kono and Rock 2008). NO ist ebenso ein essentieller Bestandteil der primären Immunabwehr und im Rahmen von Infektionen zeigen sich deutlich erhöhte NO-Konzentrationen (Clancy, Amin et al. 1998, Fang 2004). In diesen Konzentrationen weist NO zytotoxische Effekte auf, wobei die meisten durch Peroxynitrit bedingt sind, welches durch eine nicht-enzymatische, diffusionskontrollierte Reaktion von NO mit Superoxidanion entsteht (Nathan and Hibbs 1991, Huie and Padmaja 1993, Crow and Beckman 1995, Xia, Dawson et al. 1996, Botti, Möller et al. 2010).

Es ist jedoch bekannt, dass eine erhöhte Konzentration von Stickstoffmonoxid auch wiederum einen Einfluss auf die Migration und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten hat (Reddy and Standiford 2010). So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Migration Neutrophiler NO-abhängig ist und in iNOS-*knockout* Mäusen nicht auftritt (Mestriner, Spiller et al. 2007). Andererseits benötigen neutrophile Granulozyten im Rahmen ihres *oxidative Burst* (Sethi, Singh et

al. 1999) sowie für die Formierung der *NET* durch NO generierte ROS (Sethi, Singh et al. 1999, Dikshit and Sharma 2002). So steigert NO in der Frühphase der Infektion die Phagozytose der PMN (Moffat, Han et al. 1996). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine exogene Zufuhr von NO vor oder in der Frühphase eines septischen Geschehens einen positiven Einfluss auf die Mortalität hat (Lamontagne, Meade et al. 2008). Der Einsatz eines unspezifischen NOS-Inhibitors zeigte in klinischen Studien so wiederum einen schädigenden Einfluss (Lopez, Lorente et al. 2004). Wohingegen im späteren Verlauf der Sepsis NO einen hemmenden Einfluss auf Migration, Chemotaxis sowie antimikrobielle Effekte der PMN hat (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004, Alves-Filho, Tavares-Murta et al. 2006). Studien zeigten eine Downregulation des CXCR2- Rezeptors, welche durch NO erfolgt, als ursächlich für die reduzierte Migration der PMN (Rios-Santos, Alves-Filho et al. 2007). Darüber hinaus scheint Peroxynitrit, welches aus NO entsteht, ebenfalls die Migration zu behindern, die genauen Mechanismen sind noch nicht bekannt (Torres-Dueñas, Celes et al. 2007). Andererseits ist Peroxynitrit jedoch auch ein starkes *Priming*-Agens für die Neutrophilen (Rohn, Nelson et al. 1999). Sowohl PMN als auch NO nehmen sehr großen Einfluss auf den Verlauf eines septischen Geschehens, tragen an vorderster Stelle zur Eliminierung von Pathogenen bei und können die Entstehung einer Sepsis so beeinflussen. Doch auch ihre Interaktionen miteinander sind komplex, sie scheinen teils gegensätzlich zu wirken und sind bis heute noch nicht allumfänglich untersucht und bekannt.

Uns interessierte zunächst, ob es einen direkten Effekt von exogen zugeführtem NO auf die Apoptose der Neutrophilen gesunder Spender gab. Hierzu versetzten wir neutrophile Granulozyten mit DETA-NO. DETA-NO ist ein Stickstoffmonoxid-Donor der Gruppe der Diazeniumdiolate auch bekannt als NONOate (*nitric oxide/nucleophile adducts*) (Fitzhugh and Keefer 2000). Diese bestehen aus einer Diolategruppe N(O-)N=O, welche über ein Nitrogen mit einem nukleophilen Addukt verbunden ist (Maragos, Morley et al. 1991). Ein Vorteil ist die spontane Dissoziation von DETA-NO, bei welcher pro Mol DETA-NO bis zu zwei Mol NO freigesetzt werden (Miller and Megson 2007). Um eine Entzündungsreaktion zu simulieren, verwendeten wir DETA-NO in Konzentrationen von 2,5 bis 100 μM , da dies den NO- Konzentrationen, welche auch durch Aktivierung der iNOS entstehen, entspricht (Clancy, Amin et al. 1998). 100 μM DETA-NO setzen hierbei ca. 1 μM NO frei (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004). Wobei Mateo et al die höchste Konzentration von Stickstoffmonoxid bei höchster Expressionsrate der iNOS bei 1,5 μM messen (Mateo, Garcia-Lecea et al. 2003). Auch Clementi et al. erreichen bei ihrer höchsten eingesetzten DETA-NO Konzentration (0,5 mM) eine NO-Konzentration von 1,5 μM (Clementi, Brown et al. 1998). Wir verwendeten DETA-NO, da dieses im Gegensatz zu anderen NO-Donoren, welche auf zelluläre Esterasen zur NO-Freisetzung angewiesen sind, Stickstoffmonoxid spontan freisetzt. Dadurch zeigt sich eine andere Verteilung des NO in der Zelle. Fiorucci et. al zeigten, dass es bei Einsatz von DETA-NO zu einer diffusen Verteilung von NO im gesamten Zytosol und nicht zu

einzelnen intrazellulären Anhäufungen kommt (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004). Außerdem hat DETA-NO eine lange Halbwertszeit von ca. 20 Stunden und gewährleistet eine kontinuierliche NO-Freisetzung bei 37 °C (Gordge, Hothersall et al. 1998). Die ersten Versuche führten wir mit DETA-NO in Konzentrationen von 10 bis 100 µM durch. In diesen Konzentrationen zeigten sich nach 18-stündiger Inkubation annähernd ähnliche Raten der spontanen Apoptose. Wir folgerten daraus, dass NO in diesen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Apoptose der Neutrophilen zu haben scheint. Die Mittelwerte der Apoptose waren unabhängig von der hinzugefügten DETA-NO Konzentration trotz großen Standardfehlers sehr ähnlich. Auch Fiorucci et al. beobachteten keine Veränderung der spontanen Apoptose in ihrem Fall bei mononukleären Zellen nach Zugabe von 100 µM DETA-NO (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004). Gleichzeitig untersuchten wir den Einfluss von DETA-NO in den gleichen Konzentrationen auf eine durch Staurosporin-induzierte Apoptose. Auch hier sahen wir keinen signifikanten Einfluss, jedoch eine gewisse Tendenz zur Hemmung der Apoptoseinduktion des Staurosporins. Es fiel auf, dass diese Tendenz bei einzelnen Probanden am ehesten bei niedrigeren Konzentrationen auftrat. Jedoch ließ sich der Effekt nicht in allen Messwiederholungen nachweisen und war spenderabhängig. Wir schlussfolgerten, dass es möglicherweise einen konzentrationsabhängigen Einfluss von DETA-NO auf die Apoptose der Neutrophilen geben könnte. Daraufhin führten wir eine Versuchsreihe mit geringeren DETA-NO Konzentrationen von 2,5 µM bis zu maximal 10 µM durch. In dieser sahen wir einen signifikanten hemmenden Einfluss des DETA-NO sowohl auf die spontane als auch auf die durch Staurosporin induzierte Apoptose. Je geringer unsere eingesetzte Konzentration des DETA-NO, desto deutlicher war der Effekt. So zeigte sich bei einer DETA-NO Konzentration von 2,5 µM sowohl die spontane als auch die induzierte Apoptose signifikant reduziert ($p \leq .005$). Auch Kumar et al. beschreiben eine biphasische Wirkung des DETA-NO in ihrem Fall auf HL-60 Zellen, wobei sie bei höheren DETA-NO Konzentrationen (>250 µM) Apoptose sowie einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials beobachteten, wohingegen geringere Konzentrationen (1-100 µM) proliferative Effekte zeigten und antiapoptotisch wirkten (Kumar, Barthwal et al. 2010). Diese antiapoptotische Wirkung des Stickstoffmonoxids konnte auf eine Inhibierung der Caspase-3-Aktivierung zurückgeführt werden (Tejedo, Bernabé et al. 1999). Dubey et al. beobachteten nach einer 18-stündigen Inkubation der PMN mit 300 µM DETA-NO ebenfalls eine signifikant gesteigerte Apoptose, welche sie auf ein reduziertes mitochondriales Membranpotential zurückführen konnten (Dubey, Nagarkoti et al. 2016). Clementi et al. zeigten, dass geringere Konzentrationen eines NO-Donors (1-10 µM) zu einer reversiblen Beeinflussung der Cytochrom-c Oxidase (Komplex IV) führten, wodurch es zu einer vorübergehenden Hemmung der Zellatmung kommt. Wohingegen ein NO-Donor in höheren Konzentrationen (50-100 µM) zu einer irreversiblen Hemmung der Zellatmung durch S-Nitrosylierung des Komplexes I führt (Clementi, Brown et al. 1998). So können steigende intrazelluläre NO-Konzentrationen zu einer Hemmung der Zellatmung und somit zu einer Inhibierung der ATP-Produktion der PMN führen, auch wenn diese durch immunologische

Reize dazu stimuliert werden. Eine 24-stündige Inkubation mit DETA-NO zeigte eine Halbierung der ATP-Produktion und einen Anstieg der Peroxynitrit-Konzentration auf das 3-4fache. Des Weiteren schütteten mit DETA-NO behandelte Monozyten nach Zugabe von LPS deutlich geringere Mengen an Chemokinen aus (Fiorucci, Mencarelli et al. 2004). Auch Dal Secco et al. beschreiben in ihren Untersuchungen eine vermehrte Apoptose der neutrophilen Granulozyten nach Zugabe von NO und postulieren eine Apoptoseinduktion durch NO (Dal Secco, Paron et al. 2003). Zusammenfassend sahen wir in unserer ersten Versuchsreihe einen konzentrationsabhängigen Einfluss des DETA-NO auf die neutrophile Apoptose. Hierbei führte DETA-NO in niedrigen Konzentrationen (2,5-10 μM) eine signifikante Reduktion der Apoptose herbei. DETA-NO in höheren Konzentrationen (20-100 μM) zeigte keine signifikanten Veränderungen der Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Vermutlich wäre eine noch höhere Konzentration an DETA-NO nötig gewesen, um eine vermehrte Apoptoseinduktion durch NO nachweisen zu können. Kumar et al verwendeten hierfür Konzentrationen von 250-1000 μM DETA-NO, wohingegen sie bei 1-100 μM DETA-NO die proliferativen Effekte und Apoptoseinhibition beobachten konnten (Kumar, Barthwal et al. 2010). In unseren Experimenten konnten wir hingegen eine weitere Unterteilung der Wirkung von 1 bis 100 μM DETA-NO erzielen.

Der NO-Donor DETA-NO hat eine lange Halbwertszeit von ungefähr 20 Stunden, während dieser Zeit kommt es zu einer konstanten Freisetzung des NO bei 37 °C (Gordge, Hothersall et al. 1998). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Kinetik der NO-Freisetzung hat, verwendeten wir in weiteren Versuchen eine andere NO-Quelle mit schnellerer Kinetik. Hierzu diente uns eine eigens hergestellte NO-haltige Lösung, aus welcher NO in gasförmiger Form durch eine permeable Membran zu den Zellen in den darüberliegenden *wells* diffundierte. In Vorversuchen erfolgte hier zunächst die Bestimmung der NO-Konzentration mittels CLD-Messung. Eine zunächst eingesetzte 1 %ige NO-Lösung zeigte eine deutlich zu hohe Konzentration von Stickstoffmonoxid nach Diffusion in die *wells*. Letztendlich verwendeten wir sowohl eine 0,1 %ige als auch eine 0,01 %ige NO-Lösung für die nachfolgenden Experimente. Denn hier hatte sich in der CLD-Messung nach einem anfänglichen Peak eine konstante NO-Konzentration im niedrigen mikromolaren Bereich gezeigt.

Wir untersuchten hier ebenfalls sowohl die spontanen als auch die durch Staurosporin induzierten Apoptoseraten der PMN. Alle Versuche zusammengenommen zeigte sich keine signifikante Veränderung der spontanen Apoptose der Neutrophilen nach Behandlung mit 0,01 %iger NO-haltiger Lösung. Jedoch zeigten sich je nach Spender genau entgegengesetzte Effekte. Bei weiterer Analyse sahen wir, dass die neutrophilen Granulozyten, welche bei der ebenfalls untersuchten induzierten Apoptose eine Staurosporin-Resistenz aufwiesen, eine deutlich erhöhte Spontanapoptose nach Behandlung mit 0,01 %iger NO-Lösung aufwiesen. Andererseits zeigten PMN von Spendern, die keine Staurosporin-Resistenz aufwiesen, eine signifikant reduzierte

spontane Apoptose ($p < .001$). Insgesamt sahen wir so bei ca. der Hälfte der Versuche eine signifikant reduzierte spontane Apoptose nach Zugabe von 0,01 %iger NO Lösung. Die andere Hälfte der Versuche zeigte gesteigerte Apoptoseraten nach entsprechender Zugabe von NO, welche jedoch nicht signifikant waren ($p = .058$). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der Zustand der PMN einen Einfluss auf die Wirkung des Stickstoffmonoxids zu haben scheint. Paunel et al. konnten zeigen, dass PMN polytraumatisierter Patienten oder PMN, welche mit dem Serum polytraumatisierter Patienten versetzt wurden, eine Staurosporin-Resistenz aufwiesen. Sie konnten bei diesen Zellen die Stabilisierung von Mcl-1 und des mitochondrialen Membranpotentials nachweisen sowie eine verzögerte Apoptose nach Induktion durch STS (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Auch die Zellen unserer Probanden, welche eine STS-Resistenz aufwiesen, schienen folglich in irgendeiner Form präaktiviert zu sein. Somit lässt sich aus den Versuchen schlussfolgern, dass präaktivierte PMN anders auf einen schnellen Anstieg der exogen zugeführten NO-Konzentration reagieren als ruhende Neutrophile.

Da Nitrit nicht unbedingt nur ein inaktives Abbauprodukt des Stickstoffmonoxids sein muss, sondern auch selbst als NO-Donor fungieren kann (Gladwin, Raat et al. 2006), untersuchten wir den Einfluss von Nitrit auf das neutrophile Apoptoseverhalten. Um zu verifizieren, dass die verringerte Apoptose tatsächlich durch den Einfluss des Stickstoffmonoxids selbst und nicht durch sein Abbauprodukt Nitrit zustande kommt, ergänzten wir entsprechende Versuche mit Nitrit. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der Apoptoserate weder in Bezug auf die spontane noch auf die durch Staurosporin-induzierte Apoptose. Die zuvor beobachteten Effekte einer teilweisen Reduktion der Apoptose ließen sich durch Nitrit nicht erzielen und waren folglich durch NO selbst und nicht durch sein Abbauprodukt vermittelt. Auch Clementi et al. konnten zeigen, dass seine beobachtete Inhibierung der Zellatmung nach Zugabe von DETA-NO nicht durch Nitrit sondern durch NO selbst vermittelt wurde (Clementi, Brown et al. 1998).

In weiteren Versuchen erfolgte eine Analyse der unterschiedlichen Apoptoseraten auf Proteinebene mittels Western Blots. Es ist bekannt, dass eine gestörte Apoptose sowie eine Resistenz gegen Staurosporin mit einer erhöhten Proteinkonzentration des antiapoptotischen Mcl-1 Proteins korreliert (Epling-Burnette, Zhong et al. 2001, Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Wir untersuchten daher die Mcl-1 Konzentrationen der neutrophilen Granulozyten, welche eine Apoptoseresistenz nach Behandlung mit DETA-NO aufwiesen. Hier zeigte sich in ersten Western Blot Ergebnissen, dass es trotz der reduzierten Apoptose zu einem deutlichen Abbau des Mcl-1 in den Zellen gekommen war. Wir schlussfolgerten daraus, dass NO an einer anderen, möglicherweise späteren Stelle der Signalkaskade seine hemmende Wirkung auf die Apoptose zeigt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten teilweise nicht den oben beschriebenen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Mcl-1 Proteins und der gemessenen Apoptoserate feststellen. Teilweise lässt sich keine Korrelation zwischen Apoptose und Mcl-1 Expression

nachweisen. Es wird daher angenommen, dass eine Abnahme der Mcl-1 Konzentration auch durch andere Ursachen bedingt sein kann. So konnte Mcl-1 im Zytoplasma der Neutrophilen mit dessen Vesikeln und Granula nachgewiesen werden (Gardai, Hildeman et al. 2004). Möglicherweise kann es folglich auch zu einer Freisetzung des Proteins im Rahmen der Exozytose von Vesikeln bei aktivierten PMN kommen. Andererseits wird auch eine Hemmung des Mcl-1 ohne dessen Abbau diskutiert. Lee et al. beobachteten eine Bindung des Mcl-1 durch einen proapoptotisch wirkenden Liganden, wodurch es zu einer Hemmung der antiapoptotischen Mcl-1 Wirkung kommt, ohne dass das Protein jedoch abgebaut wird (Lee, Czabotar et al. 2008). Auch Paunel et al. beschreiben einen Unterschied in der Expression von Mcl-1 bei polytraumatisierten septischen Patienten im Vergleich zu nicht-septischen Patienten mit Polytrauma (Paunel-Gorgulu, Zornig et al. 2009). Somit ist es denkbar, dass auch der antiapoptotische Effekt von NO unabhängig von der Expression des Mcl-1 Proteins ist.

Es fällt jedoch auf, dass die Ergebnisse zwischen verschiedenen Spendern deutlich variieren können. Das Verhalten der PMN hängt von vielen teils spenderabhängigen Faktoren ab. Beispielsweise ist bekannt, dass das Alter der Spender Einfluss auf die Funktionalität der PMN haben kann. So kann es altersbedingt zu einer eingeschränkten Chemotaxis oder einem reduzierten *oxidative Burst* kommen. Auch antimikrobielle Effekte können altersabhängig variieren (Fulop, Larbi et al. 2004). Außerdem beeinflussen auch psychosoziale Faktoren wie Stress und unterschiedliche Lebensstile das Apoptoseverhalten. Nikotinabusus beispielsweise führt zu einer Erhöhung der Apoptose bei jedoch eingeschränkter Funktionalität (Guzik, Skret et al. 2011). Mäßiger Sport und chronischer Stress scheinen eine ähnliche Wirkung auf die PMN zu haben (Phillips, Carroll et al. 2006). Wohingegen eine intensive sportliche Betätigung zu einer Präaktivierung und folglich zu einer verzögerten Apoptose führen können (Mooren, Völker et al. 2012). Auch wir konnten einen Einfluss von Sport auf die Funktionalität der neutrophilen Granulozyten nachweisen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Apoptoseresistenz der Neutrophilen gegenüber Staurosporin bei Probanden, welche am Tag vor der Blutentnahme exzessiv Sport getrieben hatten. Im weiteren Verlauf erfolgte eine erneute Bestimmung der Apoptoserate derselben beiden Probanden ohne vorherige sportliche Betätigung, in welcher sich eine normale Apoptosereaktion und eine korrekte Apoptoseinduktion durch STS nachweisen ließen. Somit konnten wir Sport als einen Einflussfaktor auf die Neutrophile Apoptose nachvollziehen. Auch Vorerkrankungen und der aktuelle Zustand des jeweiligen Spenders zum Zeitpunkt der Blutentnahme können das Apoptoseverhalten der Neutrophilen hin zu einer Neutrophilie oder auch Neutropenie beeinflussen (Elbim, Katsikis et al. 2009). Auch wir beobachteten eine teilweise vermehrte Apoptoseresistenz bei Probanden, welche zum Zeitpunkt der Spende eine Erkältungssymptomatik zeigten.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass bei der gewählten Methode der Isolation neutrophiler Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll eine geringe Verunreinigung der PMN-Population nach Isolation in Kauf genommen werden muss. Einerseits können eosinophile Granulozyten nicht von neutrophilen Granulozyten separiert werden, andererseits kann es zu einer Verunreinigung der PMN Population durch mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten) kommen, welche 1-2 % betragen kann. Diese Verunreinigung kann zu einer Beeinträchtigung der Physiologie der PMN *in vitro* führen (Sabroe, Jones et al. 2002). Auch eine mögliche Präaktivierung der PMN durch die Isolation als solche kann möglicherweise einen Einfluss auf Ergebnisse von *in vitro* Experimenten haben, welche eine Übertragung auf den menschlichen Organismus erschweren.

Im Rahmen eines septischen Geschehens entsteht außerdem durch die Aktivierung der iNOS eine deutlich erhöhte NO-Konzentration (Pfeilschifter, Eberhardt et al. 1996). Einerseits führt diese erhöhte NO-Konzentration zu einer veränderten mikrovaskulären Homöostase mit möglicher konsekutiver Gewebehypoxie, welche ein Organversagen mit verursachen kann (Ellis, Bateman et al. 2002, Trzeciak, Dellinger et al. 2007). Andererseits ist bekannt, dass NO in der Frühphase einer Sepsis genauso wie der *respiratory burst* zu einer verbesserten Elimination von Bakterien beiträgt (Linares, Giorgio et al. 2001). Durch Zugabe von LPS sowie IF γ simulierten wir eine Entzündungsreaktion. Wir verwendeten IF γ , da es sich hierbei um den stärksten Induktor der iNOS handelt (Liew 1995). Auch LPS ist als starker Induktor der iNOS bekannt (Klaus-D. Kröncke 2000). Die daraufhin durchgeführten FACS-Analysen zeigten eine signifikant reduzierte Apoptose der PMN. Sowohl die spontane Apoptoserate ($p < .001$), als auch die durch Staurosporin-induzierte intrinsische Apoptose ($p = .029$), konnten hierdurch signifikant gesenkt werden. Somit konnten wir zeigen, dass nicht nur eine exogene NO-Zufuhr, sondern auch die endogene Entstehung von NO, wie sie im Rahmen eines Infektionsgeschehens durch eine Aktivierung der iNOS erfolgt, die Apoptoserate der neutrophilen Granulozyten signifikant reduzieren kann. Daraufhin untersuchten wir den Einfluss von DETA-NO auf diese durch proinflammatorische Zytokine vor-aktivierten PMN. Uns interessierte, ob eine zusätzliche exogene NO-Zufuhr einen weiteren Einfluss auf das Apoptoseverhalten der präaktivierten neutrophilen Granulozyten haben könnte. In der anschließenden FACS-Analyse zeigte sich jedoch kein wesentlicher Einfluss des zusätzlichen NO auf die Apoptoserate ($p = .757$).

Immer wieder wird auch der Einsatz von NOS-Inhibitoren zur Therapie einer Sepsis in der Literatur diskutiert (Boyle, Parvathaneni et al. 2000, Lopez, Lorente et al. 2004). Eine große randomisierte Placebo-kontrollierte Multicenter Studie konnte jedoch zeigen, dass der Einsatz eines nicht-selektiven NOS-Inhibitors im Rahmen der Therapie eines septischen Schocks zu einer erhöhten Mortalität führt (Lopez, Lorente et al. 2004). Wir untersuchten den Einfluss von L-NIO als nicht-selektiven Inhibitor aller NOS-Isoformen auf die Staurosporin-induzierte Apoptose der

zuvor mit proinflammatorischen Zytokinen behandelten PMN. Wir erwarteten nach entsprechender Zugabe von 250 μ M L-NIO einen Anstieg der Apoptose im Vergleich zu Kontrollzellen, welche nur mit proinflammatorischen Zytokine und DETA-NO behandelt wurden. Es zeigte sich stattdessen eine weitere Reduktion der Apoptose, welche jedoch nicht signifikant war ($p=.07$). Der Einsatz von L-NIO führte folglich zu einer Reduktion der Apoptose trotz Hemmung der NO-Produktion. Auch Dubey et al. beschreiben diese Beobachtung einer reduzierten Apoptose nach Inhibierung der iNOS. Sie postulieren, dass die iNOS eine wichtige Rolle bei der Apoptose der PMN spielt. Einerseits konnten sie eine erhöhte iNOS Expression in apoptotischen Neutrophilen nachweisen, andererseits ist die Rate der spontanen Apoptose nach Inhibierung der iNOS deutlich verringert. Als ursächlich erwies sich nach ihren Untersuchungen eine verringerte Caspase-3 Aktivität nach iNOS-Inhibierung (Dubey, Nagarkoti et al. 2016). Auch Shibata et al. konnten zeigen, dass die iNOS eine essentielle Rolle bei der Einleitung der Apoptose neutrophiler Granulozyten spielt und in iNOS-*knockout* Mäusen eine deutliche Verzögerung der neutrophilen Apoptose zu einer Aggravation der Entzündungsreaktion führt, welche wiederum durch die Zugabe von NO-Donoren verhindert werden konnte (Shibata, Nagata et al. 2010).

Neutrophile Granulozyten machen den größten Anteil der zirkulierenden Phagozyten aus. Einerseits scheint eine verzögerte Apoptose wichtig zur Entfernung von Pathogenen, andererseits ist ein verlängertes Überleben häufig mit einer gesteigerten Entzündungsreaktion assoziiert. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Stickstoffmonoxid *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose der Neutrophilen nehmen kann. Dieser ist abhängig von der zugeführten Konzentration des NO sowie von der Konstitution der PMN. So zeigten mit DETA-NO behandelte Zellen nach 18stündiger Inkubation teils eine verringerte Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Erste *Western Blots* legen nahe, dass diese Verringerung der Apoptose nicht durch das antiapoptotische Mcl-1 aus der Bcl-2 Familie vermittelt wird, da das antiapoptotische Protein auch in mit DETA-NO behandelten Proben abgebaut wird. Weitere Experimente müssen folgen, um den genauen Wirkmechanismus des NO aufzudecken und in Zukunft das Ziel, neue Behandlungsstrategien für SIRS und Sepsis zu entwickeln, zu erreichen.

5.1 Abschließende kritische Reflexion der eigenen Ergebnisse

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine experimentelle Grundlagenforschung an und mit individuellen Primärkulturen. Durch Hinzugabe von Stickstoffmonoxid und/oder IF γ sowie LPS versuchten wir bei humanen PMN eine Entzündungsreaktion *in vitro* zu simulieren. Durch Hinzugabe von Staurosporin lösten wir eine intrinsische Apoptose der Zellen aus. Bei allen durchgeführten Experimenten handelte es sich um ein vereinfachtes Modell der Wirklichkeit, welches auf das, in unseren Augen für diese Untersuchungen, Wesentliche reduziert wurde. Ein Modell kann jedoch nie die gesamte Wirklichkeit widerspiegeln und gibt vielleicht auch teilweise

einen verzerrten Blick auf die Wirklichkeit wieder. Letztendlich fiel auf, dass trotz der Vereinfachung, die ein Modell mit sich bringt, deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Spendern aber auch zwischen unterschiedlichen Spendezeitpunkten vorhanden waren. Diese erschwerten eine Interpretation der Ergebnisse. Zu welchem Zeitpunkt reagierten die Zellen, wie es zu erwarten war und zu welchem Zeitpunkt waren sie durch Vorgänge im Spender oder durch die Isolationsschritte bereits beeinflusst? Oder ist das Modell insofern realistisch, als dass Neutrophile *in vivo* ebenfalls gegensätzlich reagieren würden, je nach Immunstatus des Patienten? Dies sind Fragen, die sich nur teilweise anhand der Ergebnisse klären lassen. Eine Resistenz gegen Staurosporin diente so letztendlich als eindeutiges Zeichen für präaktivierte Zellen. Doch ließ sich nur teilweise eruieren, wodurch die Präaktivierung erfolgt war. Sport zeigte sich als einer dieser einflussnehmenden Faktoren. Doch reagierten auch Zellen von Probanden, welche zum Spendezeitpunkt weder körperliche noch psychische Anstrengung oder Stress empfanden, teils konträr. Auch die interessante Feststellung, dass HL-60 Zellen, welche häufig als Modell für neutrophile Granulozyten dienen, in unseren Experimenten ein komplett anderes Verhalten im Vergleich zu den PMN zeigten, spricht dafür, dass weitere Prozesse im Spender für das Apoptoseverhalten der Neutrophilen verantwortlich sind. Letztendlich zeigten die Ergebnisse, doch genau das, was man bei Betrachtung des Themas erwarten konnte: einen komplexen Zusammenhang zwischen Stickstoffmonoxid und neutrophilen Granulozyten sowohl im gesunden als auch im inflammatorischen Milieu, welcher durch weitere Faktoren und nicht zuletzt den Immunstatus des Probanden beeinflusst wird. Es bedarf weiterführender Experimente, um die Zusammenhänge endgültig aufzuklären.

Literaturverzeichnis

- (1992). "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis." Crit Care Med **20**(6): 864-874.
- Akgul, C., D. A. Moulding and S. W. Edwards (2001). "Molecular control of neutrophil apoptosis." FEBS Lett **487**(3): 318-322.
- Alimonti, J. B., L. Shi, P. K. Baijal and A. H. Greenberg (2001). "Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **276**(10): 6974-6982.
- Alves-Filho, J. C., F. Spiller and F. Q. Cunha (2010). "Neutrophil paralysis in sepsis." Shock **34 Suppl 1**: 15-21.
- Alves-Filho, J. C., B. M. Tavares-Murta, C. Barja-Fidalgo, C. F. Benjamim, A. Basile-Filho, S. M. Arraes and F. Q. Cunha (2006). "Neutrophil function in severe sepsis." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **6**(2): 151-158.
- Anderson, B. O., J. M. Brown and A. H. Harken (1991). "Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury." J Surg Res **51**(2): 170-179.
- Andrew JE Seely, J. L. P. a. N. V. C. (2003). "Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance." Crit Care Med **7**(4): 291-307
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo and M. R. Pinsky (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." Crit Care Med **29**(7): 1303-1310.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Avontuur, J. A., H. A. Bruining and C. Ince (1997). "Nitric oxide causes dysfunction of coronary autoregulation in endotoxemic rats." Cardiovasc Res **35**(2): 368-376.
- Bainton, D. F., J. L. Ulliyot and M. G. Farquhar (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow." J Exp Med **134**(4): 907-934.
- Barnhart, B. C., E. C. Alappat and M. E. Peter (2003). "The CD95 type I/type II model." Semin Immunol **15**(3): 185-193.
- Barry, M. and R. C. Bleackley (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nat Rev Immunol **2**(6): 401-409.
- Beasley, D., J. H. Schwartz and B. M. Brenner (1991). "Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells." J Clin Invest **87**(2): 602-608.
- Benjamim, C. F., S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2000). "Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis." J Infect Dis **182**(1): 214-223.

- Benjamim, C. F., J. S. Silva, Z. B. Fortes, M. A. Oliveira, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2002). "Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils." Infect Immun **70**(7): 3602-3610.
- Bernhard Brüne, A. v. K. a. K. B. S. (1999). "Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis." Cell Death and Differentiation: 969-975.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." J Leukoc Biol **81**(1): 1-5.
- Boggs, D. R. (1967). "The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease." Semin Hematol **4**(4): 359-386.
- Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein and W. J. Sibbald (1992). "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." Chest **101**(6): 1644-1655.
- Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz and R. A. Balk (1989). "Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group." Crit Care Med **17**(5): 389-393.
- Borutaité, V. and G. C. Brown (1996). "Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide." Biochem J **315** (Pt 1)(Pt 1): 295-299.
- Botha, A. J., F. A. Moore, E. E. Moore, B. Fontes, A. Banerjee and V. M. Peterson (1995). "Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges." Shock **3**(3): 157-166.
- Botha, A. J., F. A. Moore, E. E. Moore, F. J. Kim, A. Banerjee and V. M. Peterson (1995). "Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window." Surgery **118**(2): 358-364; discussion 364-355.
- Botti, H., M. N. Möller, D. Steinmann, T. Nauser, W. H. Koppenol, A. Denicola and R. Radi (2010). "Distance-dependent diffusion-controlled reaction of •NO and O₂•- at chemical equilibrium with ONOO." J Phys Chem B **114**(49): 16584-16593.
- Boyle, W. A., 3rd, L. S. Parvathaneni, V. Bourlier, C. Sauter, V. E. Laubach and J. P. Cobb (2000). "iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice." Circ Res **87**(7): E18-24.
- Broillet, M.-C. (1999). "S-Nitrosylation of proteins." CMLS Cellular and Molecular Life Sciences: 11036-11042.
- Bruno, S., B. Ardelt, J. S. Skierski, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz (1992). "Different effects of staurosporine, an inhibitor of protein kinases, on the cell cycle and chromatin structure of normal and leukemic lymphocytes." Cancer Res **52**(2): 470-473.
- Burns, A. R., D. C. Walker, E. S. Brown, L. T. Thurmon, R. A. Bowden, C. R. Keese, S. I. Simon, M. L. Entman and C. W. Smith (1997). "Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners." J Immunol **159**(6): 2893-2903.
- Byrne, A. and D. J. Reen (2002). "Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils." J Immunol **168**(4): 1968-1977.

- Cannistra, S. A. and J. D. Griffin (1988). "Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes." Semin Hematol **25**(3): 173-188.
- Cassina, A. and R. Radi (1996). "Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport." Arch Biochem Biophys **328**(2): 309-316.
- Chinnaiyan, A. M. (1999). "The apoptosome: heart and soul of the cell death machine." Neoplasia **1**(1): 5-15.
- Clancy, R. M. and S. B. Abramson (1995). "Nitric oxide: a novel mediator of inflammation." Proc Soc Exp Biol Med **210**(2): 93-101.
- Clancy, R. M., A. R. Amin and S. B. Abramson (1998). "The role of nitric oxide in inflammation and immunity." Arthritis Rheum **41**(7): 1141-1151.
- Clementi, E., G. C. Brown, M. Feelisch and S. Moncada (1998). "Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7631-7636.
- Clough P.N., T. B. A. (1966). "Mechanism of chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone." Dept. of Physical Chemistry, University of Cambridge: 915-925
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326 (Pt 1)**(Pt 1): 1-16.
- Condliffe, A. M., E. Kitchen and E. R. Chilvers (1998). "Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms." Clin Sci (Lond) **94**(5): 461-471.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.
- Cowburn, A. S., A. M. Condliffe, N. Farahi, C. Summers and E. R. Chilvers (2008). "Advances in neutrophil biology: clinical implications." Chest **134**(3): 606-612.
- Crawford, J., D. C. Dale and G. H. Lyman (2004). "Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management." Cancer **100**(2): 228-237.
- Crow, J. P. and J. S. Beckman (1995). "Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo." Adv Pharmacol **34**: 17-43.
- Dal Secco, D., J. A. Paron, S. H. de Oliveira, S. H. Ferreira, J. S. Silva and Q. Cunha Fde (2003). "Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis." Nitric Oxide **9**(3): 153-164.
- Dikshit, M. and P. Sharma (2002). "Nitric oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: a flowcytometric study." Methods Cell Sci **24**(1-3): 69-76.
- Drapier, J. C., J. Wietzerbin and J. B. Hibbs, Jr. (1988). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages." Eur J Immunol **18**(10): 1587-1592.
- Dubey, M., S. Nagarkoti, D. Awasthi, A. K. Singh, T. Chandra, J. Kumaravelu, M. K. Barthwal and M. Dikshit (2016). "Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism." Cell Death Dis **7**(9): e2348.

- Durham, R. M., J. J. Moran, J. E. Mazuski, M. J. Shapiro, A. E. Baue and L. M. Flint (2003). "Multiple organ failure in trauma patients." J Trauma **55**(4): 608-616.
- Edwards, S. W. (1994). Biochemistry and Physiology of the Neutrophil. Cambridge University Press, New York
- Edwards, S. W., M. Derouet, M. Howse and R. J. Moots (2004). "Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 489-492.
- Elbim, C., P. D. Katsikis and J. Estaquier (2009). "Neutrophil apoptosis during viral infections." Open Virol J **3**: 52-59.
- Ellis, C. G., R. M. Bateman, M. D. Sharpe, W. J. Sibbald and R. Gill (2002). "Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H156-164.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Engel, C., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler and K. Reinhart (2007). "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study." Intensive Care Med **33**(4): 606-618.
- Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran, Jr. and S. Wei (2001). "Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils." J Immunol **166**(12): 7486-7495.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, L. Guthrie and P. M. Henson (2001). "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases." J Immunol **166**(11): 6847-6854.
- Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." Nat Rev Microbiol **2**(10): 820-832.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.
- Feelisch, M., T. Rassaf, S. Mnaimneh, N. Singh, N. S. Bryan, D. Jourdain and M. Kelm (2002). "Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo." Faseb j **16**(13): 1775-1785.
- Fink, M. (1997). "Cytopathic hypoxia in sepsis." Acta Anaesthesiol Scand Suppl **110**: 87-95.
- Fink, M. P. (2002). "Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia." Crit Care **6**(6): 491-499.
- Fiorucci, S., A. Mencarelli, E. Distrutti, M. Baldoni, P. del Soldato and A. Morelli (2004). "Nitric oxide regulates immune cell bioenergetic: a mechanism to understand immunomodulatory functions of nitric oxide-releasing anti-inflammatory drugs." J Immunol **173**(2): 874-882.

- Fitzhugh, A. L. and L. K. Keefer (2000). "Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". Free Radic Biol Med **28**(10): 1463-1469.
- Fontana, J. A., D. A. Colbert and A. B. Deisseroth (1981). "Identification of a population of bipotent stem cells in the HL60 human promyelocytic leukemia cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3863-3866.
- Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath and H. Kleinert (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." Hypertension **23**(6 Pt 2): 1121-1131.
- Fossati, G., R. J. Moots, R. C. Bucknall and S. W. Edwards (2002). "Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIb (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes." Arthritis Rheum **46**(5): 1351-1361.
- Fulop, T., A. Larbi, N. Douziech, C. Fortin, K. P. Guerard, O. Lesur, A. Khalil and G. Dupuis (2004). "Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging." Aging Cell **3**(4): 217-226.
- Galkina, S. I., E. A. Golenkina, G. M. Viryasova, Y. M. Romanova and G. F. Sud'ina (2019). "Nitric Oxide in Life and Death of Neutrophils." Curr Med Chem **26**(31): 5764-5780.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscelli and R. Gallo (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." Blood **54**(3): 713-733.
- Gardai, S. J., D. A. Hildeman, S. K. Frankel, B. B. Whitlock, S. C. Frasch, N. Borregaard, P. Murrack, D. L. Bratton and P. M. Henson (2004). "Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils." J Biol Chem **279**(20): 21085-21095.
- Gladwin, M. T., N. J. Raat, S. Shiva, C. DeZfulian, N. Hogg, D. B. Kim-Shapiro and R. P. Patel (2006). "Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2026-2035.
- Gordge, M. P., J. S. Hothersall and A. A. Noronha-Dutra (1998). "Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione." Br J Pharmacol **124**(1): 141-148.
- Gosselin, E. J., K. Wardwell, W. F. Rigby and P. M. Guyre (1993). "Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-γ, and IL-3." J Immunol **151**(3): 1482-1490.
- Guzik, K., J. Skret, J. Smagur, M. Bzowska, B. Gajkowska, D. A. Scott and J. S. Potempa (2011). "Cigarette smoke-exposed neutrophils die unconventionally but are rapidly phagocytosed by macrophages." Cell Death Dis **2**: e131.
- Haendeler, J., U. Weiland, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (1997). "Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity." Nitric Oxide **1**(4): 282-293.
- Hallett, M. B. and D. Lloyds (1995). "Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'." Immunol Today **16**(6): 264-268.
- Hampl V., W. C. L., Archer S.L. (1996). "Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone." M. Feelisch, J.S. Stamler (Eds.), "Methods in Nitric Oxide Research", John Wiley & Sons, Chichester, UK.

- Hampton, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." Blood **92**(9): 3007-3017.
- Hayashi, F., T. K. Means and A. D. Luster (2003). "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function." Blood **102**(7): 2660-2669.
- Heinrich, P. C. (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin u.a., Springer.S.403 & 925
- Hemrich, K., K. D. Kroncke, C. V. Suschek and V. Kolb-Bachofen (2005). "What sense lies in antisense inhibition of inducible nitric oxide synthase expression?" Nitric Oxide **12**(4): 183-199.
- Hernandez, L. A., M. B. Grisham, B. Twohig, K. E. Arfors, J. M. Harlan and D. N. Granger (1987). "Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury." Am J Physiol **253**(3 Pt 2): H699-703.
- Hibbs, J. B., Jr., R. R. Taintor, Z. Vavrin and E. M. Rachlin (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule." Biochem Biophys Res Commun **157**(1): 87-94.
- Hietbrink, F., L. Koenderman, G. Rijkers and L. Leenen (2006). "Trauma: the role of the innate immune system." World J Emerg Surg **1**: 15.
- Hoesel, L. M., T. A. Neff, S. B. Neff, J. G. Younger, E. W. Olle, H. Gao, M. J. Pianko, K. D. Bernacki, J. V. Sarma and P. A. Ward (2005). "Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis." Shock **24**(1): 40-47.
- Hogg, J. C. (1987). "Neutrophil kinetics and lung injury." Physiol Rev **67**(4): 1249-1295.
- Huie, R. E. and S. Padmaja (1993). "The reaction of no with superoxide." Free Radic Res Commun **18**(4): 195-199.
- Ialenti, A., A. Iannaro, P. Maffia, L. Sautebin and M. Di Rosa (2000). "Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy." Inflamm Res **49**(8): 411-417.
- Jimenez, M. F., R. W. Watson, J. Parodo, D. Evans, D. Foster, M. Steinberg, O. D. Rotstein and J. C. Marshall (1997). "Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome." Arch Surg **132**(12): 1263-1269; discussion 1269-1270.
- Joachim Rassow, K. H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann (2012). Duale Reihe Biochemie 3. Auflage. S. 157
- Joachim Rassow, K. H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann (2012). Duale Reihe Biochemie, 3. Auflage. S. 634
- Keel, M. and O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." Injury **36**(6): 691-709.
- Kilbourn, R. G. and P. Belloni (1990). "Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin." J Natl Cancer Inst **82**(9): 772-776.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Kramer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo j **14**(22): 5579-5588.

- Klaus-D. Kröncke, Christoph. V. Suschek., and Victoria Kolb-Bachofen (2000). "Implications of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Enzyme Activity." ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING **2**: 585–605.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green and D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-1136.
- Kono, H. and K. L. Rock (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-289.
- Kröncke, K. D., K. Fehsel and V. Kolb-Bachofen (1997). "Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?" Nitric Oxide **1**(2): 107-120.
- Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4651-4655.
- Kumar, S., M. K. Barthwal and M. Dikshit (2010). "Cdk2 nitrosylation and loss of mitochondrial potential mediate NO-dependent biphasic effect on HL-60 cell cycle." Free Radic Biol Med **48**(6): 851-861.
- Kurosaka, K., N. Watanabe and Y. Kobayashi (1998). "Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells." J Immunol **161**(11): 6245-6249.
- Lamontagne, F., M. Meade, H. K. Ondiveeran, O. Lesur and A. E. Fox-Robichaud (2008). "Nitric oxide donors in sepsis: a systematic review of clinical and in vivo preclinical data." Shock **30**(6): 653-659.
- Lancaster, J. R., Jr. (2015). "Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications." Future Sci OA **1**(1): F5059.
- Lauer, T., M. Preik, T. Rassaf, B. E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch and M. Kelm (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12814-12819.
- Laurent, M., M. Lepoivre and J. P. Tenu (1996). "Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase." Biochem J **314** (Pt 1)(Pt 1): 109-113.
- Lee, E. F., P. E. Czabotar, M. F. van Delft, E. M. Michalak, M. J. Boyle, S. N. Willis, H. Puthalakath, P. Bouillet, P. M. Colman, D. C. Huang and W. D. Fairlie (2008). "A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation." J Cell Biol **180**(2): 341-355.
- Lenz, A., G. A. Franklin and W. G. Cheadle (2007). "Systemic inflammation after trauma." Injury **38**(12): 1336-1345.
- Leuenroth, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala and H. H. Simms (2000). "The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis." J Leukoc Biol **68**(1): 158-166.
- Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent and G. Ramsay (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Intensive Care Med **29**(4): 530-538.

- Liew, F. Y. (1995). "Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases." Ciba Found Symp **195**: 234-239; discussion 239-244.
- Liew, F. Y., Y. Li, A. Severn, S. Millott, J. Schmidt, M. Salter and S. Moncada (1991). "A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages." Eur J Immunol **21**(10): 2489-2494.
- Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo and S. J. Klebanoff (1996). "Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils." J Exp Med **184**(2): 429-440.
- Linares, E., S. Giorgio, R. A. Mortara, C. X. Santos, A. T. Yamada and O. Augusto (2001). "Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation." Free Radic Biol Med **30**(11): 1234-1242.
- Lindbom, L., X. Xie, J. Raud and P. Hedqvist (1992). "Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling." Acta Physiol Scand **146**(4): 415-421.
- Lopez, A., J. A. Lorente, J. Steingrub, J. Bakker, A. McLuckie, S. Willatts, M. Brockway, A. Anzueto, L. Holzapfel, D. Breen, M. S. Silverman, J. Takala, J. Donaldson, C. Arneson, G. Grove, S. Grossman and R. Grover (2004). "Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock." Crit Care Med **32**(1): 21-30.
- Lundberg, J. O., E. Weitzberg, J. M. Lundberg and K. Alving (1994). "Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air." Gut **35**(11): 1543-1546.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **11**(8): 519-531.
- Maragos, C. M., D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie and L. K. Keefer (1991). "Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects." J Med Chem **34**(11): 3242-3247.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell **78**(6): 927-930.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton and M. Moss (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med **348**(16): 1546-1554.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J. M. Jürgensmeier, S. A. Susin, H. L. Vieira, M. C. Prévost, Z. Xie, S. Matsuyama, J. C. Reed and G. Kroemer (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science **281**(5385): 2027-2031.
- Mateo, J., M. Garcia-Lecea, S. Cadenas, C. Hernandez and S. Moncada (2003). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and -independent pathways." Biochem J **376**(Pt 2): 537-544.
- Matute-Bello, G., W. C. Liles, F. Radella, 2nd, K. P. Steinberg, J. T. Ruzinski, M. Jonas, E. Y. Chi, L. D. Hudson and T. R. Martin (1997). "Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **156**(6): 1969-1977.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

Mestriner, F. L., F. Spiller, H. J. Laure, F. O. Souto, B. M. Tavares-Murta, J. C. Rosa, A. Basile-Filho, S. H. Ferreira, L. J. Greene and F. Q. Cunha (2007). "Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19595-19600.

Miller, M. R. and I. L. Megson (2007). "Recent developments in nitric oxide donor drugs." Br J Pharmacol **151**(3): 305-321.

Moffat, F. L., Jr., T. Han, Z. M. Li, M. D. Peck, W. Jy, Y. S. Ahn, A. J. Chu and L. Y. Bourguignon (1996). "Supplemental L-arginine HCl augments bacterial phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes." J Cell Physiol **168**(1): 26-33.

Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.

Moore, F. A., A. Sauaia, E. E. Moore, J. B. Haenel, J. M. Burch and D. C. Lezotte (1996). "Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon." J Trauma **40**(4): 501-510; discussion 510-502.

Mooren, F. C., K. Völker, R. Klocke, S. Nikol, J. Waltenberger and K. Krüger (2012). "Exercise delays neutrophil apoptosis by a G-CSF-dependent mechanism." J Appl Physiol (1985) **113**(7): 1082-1090.

Moulding, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White and S. W. Edwards (2001). "BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis." J Leukoc Biol **70**(5): 783-792.

Moulding, D. A., R. V. Giles, D. G. Spiller, M. R. White, D. M. Tidd and S. W. Edwards (2000). "Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells." Blood **96**(5): 1756-1763.

Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." Faseb j **6**(12): 3051-3064.

Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." Nat Rev Immunol **6**(3): 173-182.

Nathan, C. F. and J. B. Hibbs, Jr. (1991). "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." Curr Opin Immunol **3**(1): 65-70.

Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.

Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-279.

Parrillo, J. E. (1993). "Pathogenetic mechanisms of septic shock." N Engl J Med **328**(20): 1471-1477.

Paunel-Gorgulu, A., S. Flohe, M. Scholz, J. Windolf and T. Logters (2011). "Increased serum soluble Fas after major trauma is associated with delayed neutrophil apoptosis and development of sepsis." Crit Care **15**(1): R20.

Paunel-Gorgulu, A., T. Kirichevska, T. Logters, J. Windolf and S. Flohe (2012). "Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis." Mol Med **18**: 325-335.

- Paunel-Gorgulu, A., M. Zornig, T. Logters, J. Altrichter, U. Rabenhorst, J. Cinatl, J. Windolf and M. Scholz (2009). "Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation." J Immunol **183**(10): 6198-6206.
- Pettit, E. J. and M. B. Hallett (1994). "Neutrophil activation and priming during engagement of CD11b/CD18 integrins." Biochem Soc Trans **22**(3): 327s.
- Pfeilschifter, J., W. Eberhardt, R. Hummel, D. Kunz, H. Muhl, D. Nitsch, C. Pluss and G. Walker (1996). "Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase--potential for a novel class of anti-inflammatory agents." Cell Biol Int **20**(1): 51-58.
- Phillips, A. C., D. Carroll, P. Evans, J. A. Bosch, A. Clow, F. Hucklebridge and G. Der (2006). "Stressful life events are associated with low secretion rates of immunoglobulin A in saliva in the middle aged and elderly." Brain Behav Immun **20**(2): 191-197.
- Raju, T. N. (2000). "The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936)." Lancet **356**(9226): 346.
- Rassow, J. (2016). Biochemie [Lehrbuch], Stuttgart : Thieme, S.535f.
- Rastaldo, R., P. Pagliaro, S. Cappello, C. Penna, D. Mancardi, N. Westerhof and G. Losano (2007). "Nitric oxide and cardiac function." Life Sci **81**(10): 779-793.
- Reddy, R. C. and T. J. Standiford (2010). "Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis." Curr Opin Hematol **17**(1): 18-24.
- Renshaw, S. A., J. S. Parmar, V. Singleton, S. J. Rowe, D. H. Dockrell, S. K. Dower, C. D. Bingle, E. R. Chilvers and M. K. Whyte (2003). "Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL." J Immunol **170**(2): 1027-1033.
- Rios-Santos, F., J. C. Alves-Filho, F. O. Souto, F. Spiller, A. Freitas, C. M. Lotufo, M. B. Soares, R. R. Dos Santos, M. M. Teixeira and F. Q. Cunha (2007). "Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide." Am J Respir Crit Care Med **175**(5): 490-497.
- Rohn, T. T., L. K. Nelson, K. M. Sipes, S. D. Swain, K. L. Jutila and M. T. Quinn (1999). "Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response." J Leukoc Biol **65**(1): 59-70.
- Ryan, G. B. and J. V. Hurley (1966). "The chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes towards damaged tissue." Br J Exp Pathol **47**(5): 530-536.
- Sabroe, I., E. C. Jones, L. R. Usher, M. K. Whyte and S. K. Dower (2002). "Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses." J Immunol **168**(9): 4701-4710.
- Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gurp, G. van Loo and P. Vandenabeele (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." Oncogene **23**(16): 2861-2874.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.

- Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson and C. Haslett (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-875.
- Schartl, M. (2009). Biochemie und Molekularbiologie des Menschen : [mit herausnehmbarer Stoffwechselkarte & interaktiver Lerneinheit zum Citratzyklus], München : Elsevier, Urban & Fischer, S779
- Sethi, S., M. P. Singh and M. Dikshit (1999). "Nitric oxide-mediated augmentation of polymorphonuclear free radical generation after hypoxia-reoxygenation." Blood **93**(1): 333-340.
- Shibata, T., K. Nagata and Y. Kobayashi (2010). "The mechanism underlying the appearance of late apoptotic neutrophils and subsequent TNF- α production at a late stage during *Staphylococcus aureus* bioparticle-induced peritoneal inflammation in inducible NO synthase-deficient mice." Biochim Biophys Acta **1802**(11): 1105-1111.
- Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." Cell **106**(6): 675-683.
- Stichtenoth, D. O. (1997). "Stickstoffmonoxid Mediator oder Marker der chronischen Entzündung?" Der Internist **38**(5): 420-426.
- Suratt, B. T., S. K. Young, J. Lieber, J. A. Nick, P. M. Henson and G. S. Worthen (2001). "Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(4): L913-921.
- Swain, S. D., T. T. Rohn and M. T. Quinn (2002). "Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents." Antioxid Redox Signal **4**(1): 69-83.
- Taneja, R., J. Parodo, S. H. Jia, A. Kapus, O. D. Rotstein and J. C. Marshall (2004). "Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity." Crit Care Med **32**(7): 1460-1469.
- Tavares-Murta, B. M., J. S. Machado, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2001). "Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS." Inflammation **25**(4): 247-253.
- Tejedo, J., J. C. Bernabé, R. Ramírez, F. Sobrino and F. J. Bedoya (1999). "NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells." FEBS Lett **459**(2): 238-243.
- Torres-Dueñas, D., M. R. Celes, A. Freitas, J. C. Alves-Filho, F. Spiller, D. Dal-Secco, V. F. Dalto, M. A. Rossi, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2007). "Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice." Br J Pharmacol **152**(3): 341-352.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-747.
- Trzeciak, S., R. P. Dellinger, J. E. Parrillo, M. Guglielmi, J. Bajaj, N. L. Abate, R. C. Arnold, S. Colilla, S. Zanotti and S. M. Hollenberg (2007). "Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival." Ann Emerg Med **49**(1): 88-98, 98.e81-82.
- Uhle, C. P. B. H. S. K. S. S. H. M. A. W. F. (2016). "Pathogenetic aspects of sepsis-induced microcirculatory disorders and septic shock." Anästhesiologie Intensivmedizin **58**: 582-595.

Vedder, N. B., B. W. Fouty, R. K. Winn, J. M. Harlan and C. L. Rice (1989). "Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock." Surgery **106**(3): 509-516.

Wallen, C. A., R. Higashikubo and L. A. Dethlefsen (1982). "Comparison of two flow cytometric assays for cellular RNA--acridine orange and propidium iodide." Cytometry **3**(3): 155-160.

Waydhas, C., D. Nast-Kolb, M. Jochum, A. Trupka, S. Lenk, H. Fritz, K. H. Duswald and L. Schweiberer (1992). "Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma." Arch Surg **127**(4): 460-467.

Wick, M., A. Ekkernkamp and G. Muhr (1997). "[The epidemiology of multiple trauma]." Chirurg **68**(11): 1053-1058.

Xia, Y., V. L. Dawson, T. M. Dawson, S. H. Snyder and J. L. Zweier (1996). "Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6770-6774.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: biphasisches Modell des MOF modifiziert nach Moore (Moore, Sauaia et al. 1996).	3
Abb. 2: Diapedese neutrophiler Granulozyten modifiziert nach Andrew JE Seely (Andrew JE Seely 2003) ...	6
Abb. 3: extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg modifiziert nach duale Reihe Biochemie (Rassow 2016, S. 535f)	9
Abb. 4: Die Biosynthese von NO modifiziert nach Nathan (Nathan 1992)	11
Abb. 5: Zentrifugenröhrchen vor und nach Dichtegradientenzentrifugation	24
Abb. 6: Aufbau eines Chemilumineszenzdetektors	30
Abb. 7: DETA-NO	31
Abb. 8: Der Einfluss von DETA- NO (10-100 µM) auf die spontane Apoptose der PMN	33
Abb. 9: Der Einfluss von DETA-NO (10-100 µM) auf die STS induzierte Apoptose der PMN	34
Abb. 10: Reduktion der durch STS induzierten Apoptose bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN	35
Abb. 11: Reduktion der durch STS induzierten Apoptose bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN	35
Abb. 12: STS-Resistenz bei mit DETA-NO (10-100 µM) behandelten PMN	36
Abb. 13: provozierte STS-Resistenz nach sportlicher Betätigung	37
Abb. 14: induzierte Apoptose durch STS ohne vorangegangene sportliche Betätigung	37
Abb. 15: Der Einfluss von 2,5 µM DETA-NO auf die spontane Apoptose der PMN	38
Abb. 16: Der Einfluss von 5 µM DETA-NO auf die spontane Apoptose der PMN	39
Abb. 17: Der Einfluss von 2,5 µM DETA-NO auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN	40
Abb. 18: Der Einfluss von 10 µM DETA-NO auf die durch STS-induzierte Apoptose der PMN	40
Abb. 19: Western Blot des antiapoptotischen Mcl-1 Proteins	41
Abb. 20: Western Blot des Mcl-1 Proteins aus neutrophilen Granulozyten	42
Abb. 21: Der Einfluss von IFγ und LPS auf die spontane Apoptose der PMN	43
Abb. 22: Der Einfluss von IFγ und LPS auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN	44
Abb. 23: Der Einfluss von DETA-NO 5 µM auf die Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN	45
Abb. 24: Der Einfluss von DETA-NO 5 µM auf die durch STS induzierte Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN	45
Abb. 25: Der Einfluss von L-NIO auf die induzierte Apoptose von mit IFγ und LPS behandelten PMN	46
Abb. 26: Der Einfluss von Nitrit (10- 80 µM) auf die spontane Apoptose der PMN	47
Abb. 27: Der Einfluss von Nitrit (10- 80 µM) auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN	47
Abb. 28: Die spontane Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen	48
Abb. 29: Die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL 60 Zellen nach entsprechender Behandlung	49
Abb. 30: Der Einfluss von H₂O₂ auf die spontane Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen	50

Abb. 31: Der Einfluss von H₂O₂ auf die durch STS induzierte Apoptose der zu neutrophil-ähnlichen Zellen ausdifferenzierten HL-60 Zellen	50
Abb. 32: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 1 %iger NO-Lösung	51
Abb. 33: CLD Messung aller Nitrosoverbindungen nach 18-stündiger Inkubation mit 1 %iger NO-Lösung	52
Abb. 34: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 0,1 %iger NO-Lösung	53
Abb. 35: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] bei 0,01 %iger NO-Lösung	53
Abb. 36: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] nach 4 h Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung	54
Abb. 37: CLD-Messung der NO-Konzentration [ppb] nach 18 h Inkubation mit 0,01 %iger NO-Lösung	54
Abb. 38: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose der PMN	55
Abb. 39: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose nicht-STs resistenter PMN	56
Abb. 40: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose STs-resistenter PMN	56
Abb. 41: Der Einfluss von 0,01 %igem NO-Gas auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN	57
Abb. 42: Der Einfluss von 0,1 %igem NO-Gas auf die spontane Apoptose der PMN	57
Abb. 43: Der Einfluss von 0,1 %igem NO-Gas auf die durch STS induzierte Apoptose der PMN	58

Danksagung

Die Arbeit wurde im Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie (Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Forschungsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek) an der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Windolf und bei meinem Doktorvater und Forschungsleiter Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie durchführen zu können, sehr herzlich bedanken. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek für die Vergabe dieses interessanten Themas, seine stetige Unterstützung bei der Bearbeitung desselben, seine Ideen und vielseitigen konstruktiven Vorschläge, die allzeit bestehende Gesprächsmöglichkeit, sowie seinen Optimismus und seine Motivation in Phasen der Stagnation. Deine Begeisterung für die Forschung ist einfach ansteckend. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke für die freundliche Bereitstellung des DETA-NO. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Samira Seghrouchni und Frau Jutta Schneider für ihre stete Hilfsbereitschaft und zuverlässige Unterstützung bei allen Fragen rund um die praktische Durchführung der Experimente. Frau Theresia Sarabhai danke ich für die kompetente Einarbeitung, ihr offenes Ohr und die gemeinsamen Stunden vor dem *FACS*-Gerät. Mein ganz besonderer Dank gilt auch allen freiwilligen Blutspendern, ohne deren Unterstützung die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre! Ich danke dem Team des Forschungslabors für das tolle Arbeitsklima und den freundlich-kollegialen Umgang, den ich dort erfahren durfte. Ein ganz besonders herzliches Dankeschön möchte ich an meine Familie richten: ich danke euch für eure immer vorhandene, vielfältige Unterstützung während meines Studiums, bei der Fertigstellung meiner Dissertation und in allen Lebenslagen. Danke, dass ihr immer für mich da seid! Ich danke meiner Schwester Annika für entspannte, gemeinsame Abende nach stressigen Tagen, ob nun beim Sport oder auf dem Sofa. Zu guter Letzt danke ich dir, lieber Max, dafür, dass du immer für mich da bist, mich motivierst und in Allem unterstützt.