

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. Joachim Windolf

**Die Rolle der p38 MAPK und PI3K-/Akt Signalwege
für die Apoptoseresistenz in Neutrophilen
Granulozyten nach Polytrauma**

Dissertation

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

vorgelegt von
Ina Caroline Rump
2021

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

I Zusammenfassung

Die Rolle der p38 MAPK und PI3K-/Akt Signalwege für die Apoptoseresistenz in Neutrophilen Granulozyten nach Polytrauma

Nach einem Polytrauma kommt es zu einer Hyperinflammation und einer damit einhergehenden Einwanderung von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) an den Ort des geschädigten Gewebes. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass PMN nach Polytrauma eine verminderte Apoptoserate aufweisen. Zudem zeigt sich eine intrinsische Apoptoseresistenz der PMN gegen Staurosporin (STS), welche durch Serumfaktoren vermittelt wird. Ein wichtiges Apoptose-regulierendes Protein in PMN ist Mcl-1. Sowohl die Kinasen PI3K als auch die p38 MAPK sind in der Modulation der Mcl-1 Stabilität involviert. Des Weiteren wird Mcl-1 durch die Glykogensynthasekinase (GSK-3) phosphoryliert, was zu dessen Abbau führt. Die Arbeit soll die Bedeutung der Kinasen und von Mcl-1 für die Apoptoseresistenz in PMN nach Polytrauma weiter aufklären.

In dieser Arbeit wurden PMN aus dem Blut gesunder Probanden in An- und Abwesenheit von Serum polytraumatisierter Patienten kultiviert. Parallel wurden die Kinasen PI3K, p38 MAPK und GSK-3 inhibiert. Die spontane Apoptose wurde jeweils durch Propidiumiodidfärbung, die mitochondriale Membrandepolarisation durch JC-1 Färbung und anschließender FACS Analyse bestimmt. Die Mcl-1 Gen- und Proteinexpression wurden mittels qRT PCR und Western Blot untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kinasen PI3K und p38 MAPK an der Modulation der Mcl-1 Gen- und Proteinexpression in PMN beteiligt sind. Die Inhibition der Kinasen führt zur Abnahme von Mcl-1 und gleichzeitig zu einer Erhöhung der Apoptose in PMN. Ferner scheinen die Kinasen auch für die Mcl-1-abhängige STS-Resistenz, die nach Trauma beobachtet wird, von Bedeutung zu sein. Auch die GSK-3 ist am Apoptoseverhalten der PMN beteiligt. Durch Inhibition der GSK-3 zeigt sich eine Abnahme der Apoptose. Vor allem die Inhibition von PI3K könnte einen möglichen Therapieansatz zur Modulation der Apoptoseresistenz in PMN nach Polytrauma darstellen mit dem Ziel, die Prognose dieser Patienten zu verbessern.

II Summary

The role of the p38 MAPK and PI3K-/Akt pathway in neutrophils resistant to apoptosis after severe trauma

Severe trauma leads to an enhanced inflammatory response and migration of polymorphnuclear leukocytes (PMN) into the damaged tissue. The results of previous work indicate a decreased rate of apoptosis of PMN after polytrauma. Moreover, it has been shown that PMN are characterized by staurosporine resistant apoptosis, which is mediated through serum factors. An important apoptosis regulating protein in PMN is antiapoptotic myeloid-cell leukemia 1 (Mcl-1). The kinases PI3K and p38 MAPK are involved in the modulation of stability of Mcl-1. Furthermore, Mcl-1 is phosphorylated by Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) leading to its degradation. In the present study we wanted to clarify the role of the above mentioned kinases and Mcl-1 for apoptosis resistance in PMN after severe trauma.

PMN from healthy volunteers were isolated and cultivated with or without serum from patients who suffered from polytrauma. In addition, the kinases PI3K, p38 MAPK and GSK-3 were inhibited. Spontaneous apoptosis was measured by propidium iodide staining, mitochondrial membrane depolarization was measured by JC-1 staining, both followed by FACS analysis. Mcl-1 gene and protein expression were analysed by qRT PCR and Western blot.

The results indicate that PI3K and P38 MAPK are involved in modulation of Mcl-1 gene and protein expression in PMN. The inhibition of the kinases leads to a diminished Mcl-1 and to an increased rate of apoptosis in PMN. Furthermore, the kinases PI3K and p38 MAPK seem to be involved in Mcl-1 dependent STS resistance after severe trauma. Also GSK-3 regulates apoptosis in PMN, since the inhibition of GSK-3 results in decreased apoptosis.

Especially the inhibition of PI3K seems to be a possible target to modulate apoptosis resistance in PMN after severe trauma. The attenuation of apoptosis resistance may represent a new therapeutical approach to improve the prognosis of trauma patients.

III Abkürzungsverzeichnis

AIF	<i>apoptosis- inducing factor</i>
AIS	<i>abbreviated Injury Scale</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1 (Apoptose Protease-aktivierender Faktor 1)</i>
APS	Ammonium Persulfat
Bcl-2	<i>B-Cell lymphoma 2</i>
BH	Bcl-2-homology
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DIABLO	<i>direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low PI</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERK 1	<i>extracellular signal-related kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FasR	<i>Fas receptors</i>
<i>fMLP</i>	<i>Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin</i>
<i>G-CSF</i>	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
HGF	<i>haematopoetic growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
INF- γ I	Interferon-gamma
INR	<i>international normalized ratio</i>
ISS	<i>injury severity score</i>
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JNK/SAPK	<i>c-jun N-terminal kinases/ stress-activated protein kinases</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
Mcl-1	<i>myeloid cell leukemia 1</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMP	Mitochondriales Membranpotenzial
MODS	<i>multi organ dysfunction syndrome</i>
MOV	Multiorganversagen
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
Omi/HtrA2	<i>high-temperature requirement protein A2</i>
PAF	Plättchenaggregierender Faktor
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS w/o Mg/Ca	Phosphatgepufferte Lösung ohne Magnesium und Calcium
PDGF	platelet-derived growth factor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5 Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PH	<i>pleckstrin-homology</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten

PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-1640	Zellkulturmedium, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Tyrosinkinase Rezeptoren
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
STS	Staurosporin
TAB1	<i>transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein 1</i>
tBid	<i>truncated BH3 interacting domain death agonist</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

IV Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das Polytrauma	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie des Polytraumas	1
1.1.2	Das <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (SIRS) und die Sepsis.....	2
1.1.3	Grundlagen des Immunsystems	3
1.1.4	Die Pathophysiologie bei einem Polytrauma	4
1.2	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten	5
1.3	Der Zelltod	6
1.3.1	Apoptose und Nekrose	6
1.3.2	Regulation der Apoptose	7
	Funktion der Caspasen	7
	Regulation der Apoptose über Mitochondrien	7
1.3.3	Der p38 MAP-Kinase Signalweg	8
1.3.4	Der PI3K/Akt-Signalweg	10
1.3.5	Das antiapoptotische Protein Mcl-1	11
1.3.6	Verzögerte Apoptose in PMN nach Polytrauma	12
2	Ziele der Arbeit und Fragestellung.....	13
3	Material	14
3.1	Geräte und Zubehör	14
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
3.3	Chemikalien und Reagenzien.....	16
3.4	Oligonukleotide/ Primer	17
3.5	Medien, Puffer und Lösungen	18
3.6	Inhibitoren	20
3.7	Antikörper	21
3.8	Kits.....	21
3.9	Software/ Programme.....	21
3.10	Aufnahmekriterien der Patienten in die Studie	22
4	Methoden	23
4.1	Isolierung von PMN aus humanem Vollblut.....	23

4.2	Zellzahl-Bestimmung mit der Neubauer Zählkammer	24
4.3	Kultivierung von humanen PMN	24
4.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate	25
	4.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	25
	4.4.2 Bestimmung der Apoptoserate nach der Methode von Nicoletti	25
	4.4.3 Bestimmung der frühen Apoptose durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)	26
4.5	Bestimmung der Genexpression	27
	4.5.1 Probenvorbereitung und Isolierung der RNA.....	27
	4.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	28
	4.5.3 Reverse Transkription	29
	4.5.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT PCR) 29	
4.6	Proteomische Analysen	32
	4.6.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration	32
	4.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
	4.6.3 Transfer	33
	4.6.4 Immundetektion	34
	4.6.5 Statistische Analyse	35
5	Ergebnisse	36
	5.1 Studienkonzept und Versuchsaufbau	36
	5.2 Der Effekt der p38- bzw. PI3K-Inhibition auf die spontane Apoptose von PMN nach Stimulation mit Serum von Polytrauma-Patienten.....	37
	5.3 Der Effekt der p38-bzw. PI3K-Inhibition auf die Mcl-1 mRNA-Expression	38
	5.4 Der Einfluss der p38-bzw. PI3K-Inhibition auf die STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma	40
	5.5 Der Effekt der GSK-3-Inhibition auf das Apoptoseverhalten der PMN 44	
6	Diskussion.....	47

Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblick.....	57
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	58
8 Anhang.....	76
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	76

1 Einleitung

1.1 Das Polytrauma

1.1.1 Definition und Epidemiologie des Polytraumas

Bei einem Trauma handelt es sich um eine Gewalteinwirkung auf den Körper, die zu einer Verletzung des Organismus führt. Im Jahr 1998 starben ca. 5,8 Millionen Menschen weltweit an den Folgen eines Traumas (1). Auch wenn seitdem die Mortalität in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zurückgegangen ist, zeigte die Global Burden of Disease Study, dass im Jahr 2013 immer noch ca. 4.8 Millionen Menschen pro Jahr an den Folgen eines Traumas verstarben (2). In der Gruppe der 15-29-Jährigen sind Verkehrsunfälle die häufigste Todesursache. Allein 2016 starben 1,35 Millionen Menschen weltweit in Folge eines Unfalles im Straßenverkehr (WHO, *global status report on road safety 2018*). Insbesondere das Polytrauma hat auf Grund der Schwere der Verletzungen eine hohe Morbidität und Mortalität (3). Das Polytrauma ist definiert als eine Verletzung von mehreren Körperregionen oder Organsystemen, von denen mindestens eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen vital bedrohlich ist (4).

Für die genaue Beurteilung und exakte Beschreibung der Schwere eines Polytraumas hat sich der *injury severity score* (ISS) etabliert. Er wurde 1974 von Susan Baker eingeführt und beschreibt die Schwere der Verletzungen nach anatomischen Verletzungsgraden. Basierend auf dem *abbreviated injury scale* (AIS) wird jede der Verletzungen einer von sechs Körperregionen zugeteilt und je nach Schwere der Verletzungen eine Zahl von 1-6 zugeordnet, wobei die Zahl eins leichten Verletzungen entspricht, die Zahl 6 tödlichen Verletzungen. Die zugeordnete Zahl der drei am schwersten verletzten Körperregionen werden quadriert. Die Summe der quadrierten Werte ergibt den ISS (5,6). Beim Polytrauma liegt die Verletzungsschwere nach ISS bei ≥ 16 Punkte (7). Im Verlauf wurde die Definition des Polytraumas stetig überarbeitet, so auch 2016 in der Berliner Definition, in welcher neben dem ISS weitere fünf physiologische Parameter mit einbezogen werden (systolischer Blutdruck ≤ 90 mmHg, Glasgow Coma Scale ≤ 8 , Azidose mit einem BE ≤ -6 , Koagulopathie mit partieller Thromboplastinzeit ≥ 40 s oder INR von $\geq 1,4$, Alter ≥ 70 Jahre). Hiernach ist ein

Polytrauma definiert als ein AIS ≥ 3 von mehr als zwei Körperregionen sowie Vorliegen von einem oder mehr der o.g. physiologischen Parametern (7).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte die Mortalität polytraumatisierter Patienten vor allem durch Optimierung der präklinischen und klinischen Versorgung stetig gesenkt werden (8). Trotzdem stellt das Trauma nach wie vor die häufigste Todesursache in der Gruppe der unter 40-Jährigen weltweit dar (7,9).

Die Letalität nach einem Polytrauma lässt sich in drei unterschiedliche Zeitfenster einteilen. Studien von Baker et al. haben gezeigt, dass 53% der Betroffenen bereits innerhalb der ersten Stunde nach dem Unfall am Unfallort an den Verletzungen versterben (*immediate death*) (5,10). Ein weiterer Teil der Patienten (ca. 30%) verstirbt innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Unfall und wird zu der Gruppe der frühen Todesfälle (*early deaths*) gezählt. Werden diese beiden kritischen Phasen überlebt besteht ein erhöhtes Risiko an den Folgen von immunologischen Dysfunktionen zu versterben. Nahezu 80% dieser späten Todesfälle (*late deaths*) nach schwerem Trauma sind auf eine Sepsis, ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) oder auf ein Multiorganversagen (MOV) zurückzuführen (5,11).

1.1.2 Das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) und die Sepsis

Das Risiko der Entwicklung eines SIRS und potenziell Entwicklung eines MOVs stellt eine große Herausforderung für die Behandlung von Polytrauma-Patienten dar (12). Unter einer SIRS versteht man eine Regulationsstörung des Wirtes mit infektiöser oder nicht-infektiöser Ursache. Zu den nicht-infektiösen Ursachen zählen Verbrennungen, Pankreatitiden nicht infektiöser Ursache sowie das Polytrauma (13). Aus der Gruppe der Patienten mit Indikation zur intensivmedizinischen Behandlung entwickeln über 50% ein SIRS (14).

Auf einer Konferenz im Jahr 1991 (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference) wurde von einem Expertenkommittee eine Definition des SIRS festgelegt. Um die Kriterien des SIRS zu erfüllen, müssen mindestens zwei der im Folgenden aufgelisteten Punkte zutreffen:

- Fieber (≥ 38 °C) oder Hypothermie (≤ 36 °C)
- Tachykardie mit einer Herzfrequenz ≥ 90 /min

- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation (bestätigt durch Abnahme des $\text{PaCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$ bzw. 33 mmHg in arterieller Blutgasanalyse)
- Leukozytose ($\geq 12\,000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($< 4000/\mu\text{l}$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Bei Zutreffen zwei dieser Kriterien sowie positive Blutkulturen oder Zutreffen aller vier SIRS Kriterien sprach man von einer Sepsis, eine Sepsis mit Organversagen wurde als schwere Sepsis definiert (13).

In den folgenden Jahrzehnten wurden die Definitionen der Sepsis fortlaufend überarbeitet, sodass man heute unter der Sepsis eine akute lebensbedrohlich Dysfunktion mit Dysregulation des Organismus durch eine Infektion versteht, eine Einschätzung der Mortalität erfolgt durch einen Score, dem SOFA-Score (15).

1.1.3 Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem stellt einen Schutzmechanismus dar, um den Körper vor Mikroorganismen, Bakterien und anderen Pathogenen zu schützen. Es unterteilt sich in das angeborene unspezifische und das erworbene spezifische Immunsystem (16).

Das spezifische Immunsystem ist gekennzeichnet durch eine Antigen-spezifische Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten sowie durch ein immunologisches Gedächtnis. Die Spezifität gegen ein bestimmtes Pathogen wird durch spezielle Genuklagerung/ Gen-Rearrangements nach erstmaligen Antigen-Kontakt erreicht, was bei erneutem Kontakt eine spezifische, gegen ein bestimmtes Antigen gerichtete Immunantwort gewährleistet (17,18). Die spezifische Immunantwort benötigt jedoch einige Tage bis Wochen, bis sie sich entwickelt (16,19).

Zum unspezifischen Immunsystem zählen eine Reihe phagozytotisch wirksamer und antigenpräsentierender Zellen wie die Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, sowie humoraler Komponenten z.B. dem Komplementsystem und weiteren Botenstoffen, den Zytokinen, die von Zellen des Immunsystems ausgeschüttet werden (19,20). Das angeborene unspezifische Immunsystem repräsentiert die *first line defense*, und ist durch eine antigen-unabhängige, unmittelbar einsetzende Immunantwort innerhalb kürzester Zeit nach Antigenbefall des Wirtes gekennzeichnet (21).

1.1.4 Die Pathophysiologie bei einem Polytrauma

Auf pathophysiologischer Ebene kommt es durch die Schwere der Verletzungen bei einem Polytrauma und den dadurch bedingten Gewebeschäden zunächst zu einer Aktivierung des unspezifischen Immunsystems (22). Auch postoperative Gewebeschäden scheinen an der Aktivierung beteiligt zu sein (23). Die Grundlage für die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems stellt die *pattern recognition* dar. Die *pattern recognition receptors* (PRRs) werden auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert (24), können aber auch als lösliche Rezeptoren intrazellulär und in der Gewebsflüssigkeit oder Blutbahn vorkommen (25).

Unter infektiösen Bedingungen erkennen PRRs bestimmte Oberflächenmoleküle von Pathogenen, die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder auch nicht-mikrobielle Moleküle, die *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (24). Diese werden im Rahmen von sterilen Verletzungen so auch bei einem mechanischen Trauma, unter hypoxischen Zuständen oder bei Verbrennungen von zerstörten Zellen freigesetzt (26). Durch die Bindung der Moleküle an die Rezeptoren werden auch vermehrt proinflammatorische Zytokine exprimiert. Hierdurch wird eine verstärkte *host defense*, Zunahme der Phagozytose, Rekrutierung von Immunkompetenten Zellen zum Ort der Inflammation, ausgelöst (24). Gleichzeitig ist bekannt, dass es zu einer Abnahme der Apoptoserate der Leukozyten während der Inflammation kommt (27). Um den autodestruktiven Effekten der immunkompetenten Zellen entgegenzuwirken, kommt es zu einer Herabregulation der Lymphozyten-Funktion und zu einer erhöhten Apoptoserate der Lymphozyten. Als Folge werden weniger proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet (28). Dieses anti-inflammatorische Geschehen wird auch *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) genannt (28–30). Die vermehrte Ausschüttung anti-inflammatorischer Mediatoren bedingt eine Suppression des Immunsystems und erhöht dabei zusätzlich die Infektanfälligkeit und potenziell die Entwicklung einer Sepsis (31). Als Folge einer schweren systemischen Inflammation kann sich ein *multi organ dysfunction syndrome* (MODS) entwickeln (32). Im Verlauf kann dies zum Multiorganversagen führen. Ein derart schwerer Verlauf tritt bei ca 5% der Polytrauma-Patienten auf (33). Entwickelt sich ein MOV im Rahmen eines SIRS, spricht man von einem frühen MOV, das späte MOV ist definiert als Organversagen, das im Rahmen eines CARS entsteht (34).

1.2 Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten

Eine Zellart, die bei der frühen unspezifischen Immunantwort eine zentrale Rolle einnimmt, sind Polymorphkernigen Neutrophile Leukozyten (PMN). Insgesamt machen sie 50-70% aller Leukozyten aus (35) und sind durch eine kurze Halbwertszeit von 6-8h charakterisiert (36).

Im physiologischen Zustand des Organismus befinden sich die PMN in einem ruhenden Zustand. Dies gewährleistet, dass die toxischen Bestandteile in den Granula nicht zu einem ungewünschtem Gewebeschaden im Organismus führen (37). Die Aktivierung der PMN erfolgt dann in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (38). Durch Stimuli wie Chemokine und Zytokine kommt es zunächst zum Priming der PMN (39,40). Durch das Priming werden zum einen in den Granula gespeicherte Rezeptoren in die Plasmamembran eingebaut, aber auch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die zu einem Anstieg der de novo Synthese von Zytokinen und Rezeptoren führt (39). Hierdurch werden die PMN in einen Zustand der verstärkten Bereitschaft überführt, schnell auf inflammatorische Stimuli zu reagieren (40). Dem Priming folgt die Rekrutierung der PMN an den Ort der Inflammation (41). Die Migration aus dem Gefäßsystem ins umliegende Gewebe folgt hierbei einem bestimmten Ablauf. Diese leukozytäre Adhäsionskaskade besteht aus den Schritten *loose tethering*, *rolling*, *adhesions strengthenig*, *paracellular or intracellular transmigration*– einem Rollen der PMN am Gefäßendothel, eine Adhäsion ans Endothel via Selektinen und Integrinen und eine Migration ins umliegende Gewebe. Nach der Migration ins Gewebe folgen die PMN dem chemotaktischen Gradienten an den Ort der Inflammation (42). Die Bekämpfung von Pathogenen erfolgt durch Phagozytose, Degranulation, oxidativen Burst (Freisetzung von für das Pathogen toxischen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)) und durch die Freisetzung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) (20,43). Die PMN sind außerdem befähigt, über MHC-II Moleküle den T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren, -damit stellen sie als antigenpräsentierende Zellen des erworbenen Immunsystems eine wichtige Verbindung zwischen spezifischer und unspezifischer Immunantwort dar (44). Auch nach schwerem Trauma und einem damit einhergehendem Gewebeschaden zeigt sich eine Aktivierung der Neutrophilen nach oben genannten Mechanismen und einer daraus resultierenden systemischen Inflammation (45).

1.3 Der Zelltod

1.3.1 Apoptose und Nekrose

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes, bei der es zu einem gezielten Absterben von Zellen im Organismus kommt. Carl Vogt beschrieb bereits Mitte des 19. Jh im Rahmen der Metamorphose von Amphibien einen gezielten Abbau unerwünschten Gewebes (46). Der Begriff Apoptose selber geht auf die Wissenschaftler Kerr, Wyllie und Currie zurück, die 1972 den programmierten Zelltod von der Nekrose, dem pathologischen Absterben einer Zelle abgrenzen wollten (47,48).

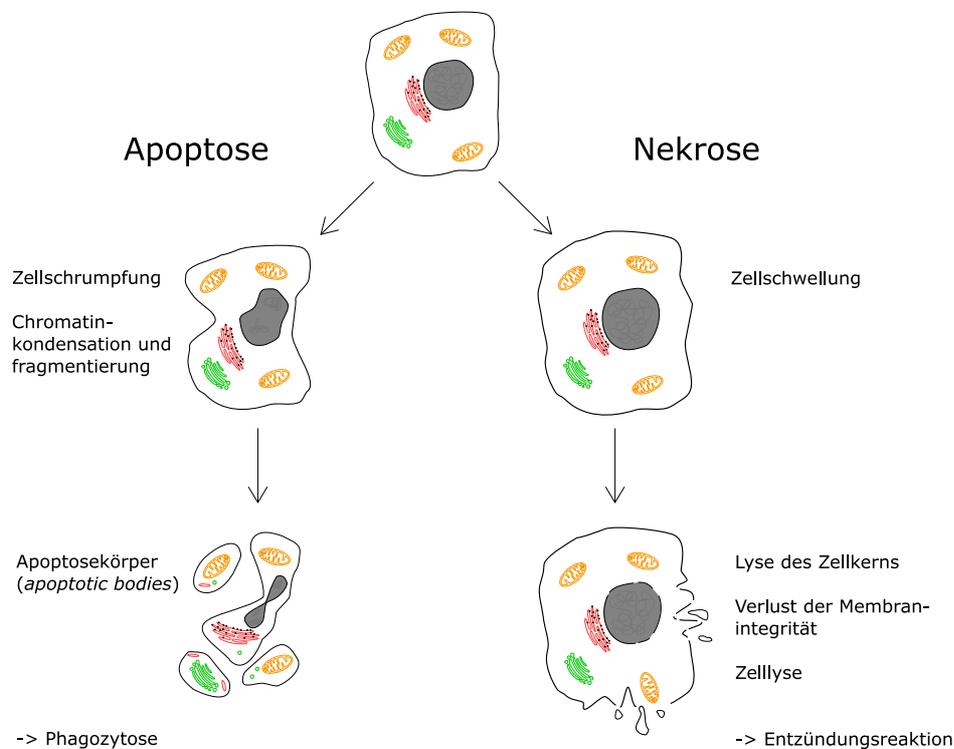


Abbildung 1 | Der Zelltod: Apoptose vs. Nekrose (modifiziert nach Williams et al. (49)) Während der Anfangsphase der Apoptose kommt es zu einer Abnahme des zellulären Volumens (Pyknosis). Das Chromatin im Zellkern kondensiert und fragmentiert zunehmend (Karyohexis). Die Zelle zerfällt in viele kleine membranumgebene Vesikel (apoptotic bodies), welche das kondensierte Chromatin und weitere Zellorganellen enthalten (50). Die membranumschlossenen Vesikel werden von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen phagozytiert. Die Apoptose betrifft meist einzelne Zellen (48). Diesen Beobachtungen gegenüber stehen morphologische Änderungen, bei denen es zu einer Schwellung und darauffolgenden Lyse des Zellkerns (Karyolysis), einem Verlust der Membranintegrität und zu einer Zellyse kommt. Die Zellorganelle des Zytoplasma gelangen in das umliegende Gewebe, was letztendlich zu einer Entzündungsreaktion führt. Dieser Prozess wird als Nekrose bezeichnet (51).

Die Apoptose spielt beim planmäßigen Zelluntergang z.B. der Embryogenese und bei der Aufrechterhaltung des Organismus (Homöostase) durch regulären Zellumsatz eine entscheidende Rolle (48). Die Apoptose steht unter genetischer Kontrolle und kann sowohl durch eine innere Uhr als auch durch äußere extrazelluläre Faktoren induziert werden. Zu den extrazellulären Faktoren zählen Hormone, Zytokine und Killerzellen sowie chemische oder physikalische Substanzen und Viren (52).

1.3.2 Regulation der Apoptose

Funktion der Caspasen

Apoptose ist ein komplexer, genau aufeinander abgestimmter Prozess, an dem eine Reihe regulierender Proteine beteiligt sind (53).

Detailliertere Erkenntnisse über die genetischen Grundlagen der Apoptose konnten durch Studien am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass bei der Apoptose auch die Genprodukte *ced-3* und *ced-4* an der Auslösung eines linearen, aufeinander abgestimmten Signalweges beteiligt sind, die im Verlauf zum Untergang von 131 der insgesamt 1090 generierten Zellen führen (54). In weiteren Studien wurden auch bei Säugetieren *ced* verwandte Gene, die Cystein-Proteasen identifiziert (55). Der Familie der Cysteinproteasen gehören auch die Caspasen an (56). Caspasen sind Teil einer Enzymkaskade und liegen in den Zellen als inaktive Proenzyme vor (57). Durch proapoptotische Stimuli können sie in zwei Untereinheiten gespalten werden, was zu deren Aktivierung führt (58). Aktivierte Caspasen übernehmen die Funktion, weitere Caspasen sowie andere zelluläre Proteine (u.a. einige Mitglieder der Bcl-2 Familie) zu aktivieren (59).

Regulation der Apoptose über Mitochondrien

Neben der extrinsischen Apoptose, bei der extrazelluläre Stimuli über Todesrezeptoren zu einer Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC), Aktivierung der Caspase-8 und Induktion der Apoptose führen (60,61), stellt der intrinsische Apoptoseweg einen weiteren Möglichkeit dar (52). Eine wichtige Funktion hierbei nimmt das Mitochondrium ein, weshalb man auch vom mitochondrialem Apoptoseweg spricht (62,63). Die pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie nehmen dabei Einfluss auf das Zellüberleben (64). Ob eine Zelle überlebt oder die Apoptose

eingeleitet wird, hängt vom Verhältnis der pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen ab (65). Zu den antiapoptotischen Mitgliedern zählen die Proteine Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL, Bcl-b, Mcl-1 und A1, zu den proapoptotischen Bcl-2 Proteinen zählen Bax, Bad und Bok. (66). Die proapoptotischen Proteine führen zu einer Porenbildung zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran, durch welche als Folge weitere proapoptotische Proteine ins Zytosol freigesetzt werden (67).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass PMN zwar wenige Mitochondrien besitzen, deren Funktion jedoch hauptsächlich auf die Regulation der Apoptose reduziert ist (67). Insgesamt werden in verschiedenen Zellen unterschiedliche Mitglieder der Bcl-2 Familie exprimiert. PMN exprimieren die proapoptotische Proteine Bax, Bid, Bak und Bad (68). Das einzige antiapoptotische Protein, das sowohl auf Protein- als auch auf Genebene in PMN nachgewiesen werden konnte ist Mcl-1 (69).

1.3.3 Der p38 MAP-Kinase Signalweg

Die p38 *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) sind Serin-Threonin Kinasen und kontrollieren eine Reihe zellulärer komplexer Prozesse (70). Sie sind an der Transduktion extrazellulärer Stimuli zu intrazellulären Antworten beteiligt und nehmen eine wichtige Funktion im Apoptoseverhalten der Zellen ein (71).

Man unterscheidet mindestens vier verschiedene Gruppen von MAPK. Neben den p38 MAPKs gehören die *extracellular signal-related kinases* (ERK 1 und 2), die *c-jun N-terminal kinases/ stress-activated protein kinases* (JNK/SAPK 1, 2 und 3) und die ERK 5 der Gruppe der MAPKs an (72).

Jede dieser Transduktionskaskaden lässt sich in drei hierarchisch aufeinanderfolgende Schritte untergliedern und umfasst die Aktivierung nacheinander geschalteter Kinasen (73). Von der p38 gibt es insgesamt 4 Isoformen, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , die jedoch nicht in allen Zelltypen gleich exprimiert werden (70,74,75). In PMN werden, soweit bekannt, lediglich die Isoformen p38 α und p38 δ exprimiert (76,77).

Die Transduktionskaskade der p38 MAPKs wird durch zellulären Stress wie UV-Strahlung, starke Hitze, osmotischen Stress, Lipopolysaccharide, Hypoxie und Ischämie sowie durch Inhibitoren der Proteinsynthese oder durch proinflammatorische Zytokine induziert (78–80). Die Transduktion dieser extrazellulären zu intrazellulären Signalen erfolgt durch Tyrosinkinaserzeptoren oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (81). Die extrazellulären Stimuli führen zu einer Aktivierung zahlreicher unterschiedlicher

MAPKKKs, welche dann MAPKKs aktivieren (82). Zu den p38 MAPK Signalkaskade aktivierenden MAPKKs zählen die MKK3 sowie die MKK6, welche jeweils durch Phosphorylierung aktiviert werden (55). Unter bestimmten Umständen, zb. wenn UV-Strahlen auf die Zelle einwirken, kann die p38 auch durch die MKK4, einem Aktivator der JNK aktiviert werden (83). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen p38 α und dem Protein TAB1 (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1 (TAK1)-binding protein 1) die Autophosphorylierung von p38 α induziert und diese dadurch ebenfalls aktiviert (84). Die aktivierte p38 reguliert wiederum durch Phosphorylierung an Serin und/oder Threonin-Resten Substrate, die an inflammatorischen Antworten beteiligt sind (70). Die Funktion der p38 MAPK in PMN ist noch nicht vollständig geklärt, es werden ihr sowohl proapoptische als auch antiapoptische Funktionen zugesprochen (85,86). Es ist bekannt, dass die spontane Apoptose der PMN in Patienten nach Polytrauma und /oder Sepsis herabgesetzt ist (87,88). So resultiert die Aktivierung der P38 MAPK in PMN während einer Inflammation beispielsweise in einer erhöhten IL-8 Produktion, Chemotaxis, Degranulation sowie dem oxidativem Burst (81). Demgegenüber konnte in ovariellen Tumorzellen über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *myocyte enhancer factor-2* (MEF2) eine proapoptische Funktion gesehen werden (89).

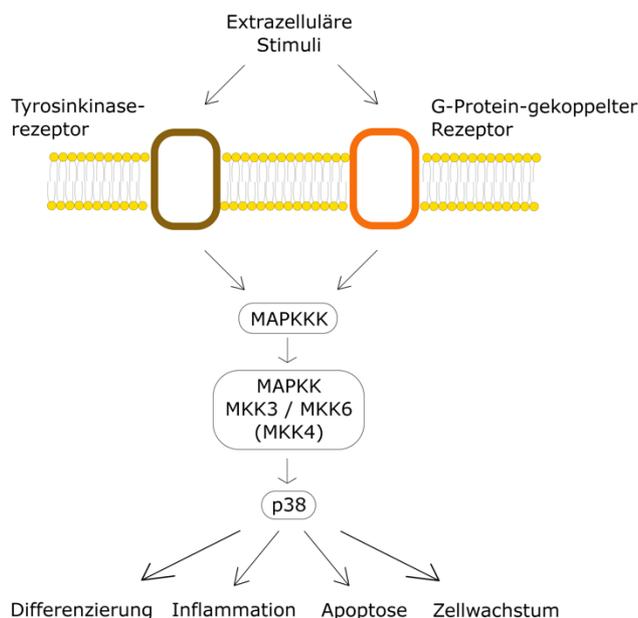


Abbildung 2 | Schematische Darstellung der p38-Signalkaskade (modifiziert nach Kolch (Kolch 2000))

1.3.4 Der PI3K/Akt-Signalweg

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der Einfluss auf Zellüberleben, Zelldifferenzierung und Zellproliferation nimmt, ist der PI3K-/Akt Signalweg (90). Die Bindung von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF), Insulin, *platelet-derived growth factor* (PDGF) sowie von Thrombin, Zykokinen und Hormonen an Tyrosinkinaserzeptoren (RTK) führt zu einer Dimerisierung der RTKs, einer dadurch ausgelösten Autophosphorylierung der RTKs an einem Tyrosinrest und Aktivierung der PI3K (92–94). Die PI3Ks sind Heterodimere und lassen sich in drei Klassen (I,II,III) einteilen (95). Die am besten charakterisierte Klasse ist die PI3K I, die wiederum in die Unterformen IA und IB eingeteilt wird (96). Die PI3K IA besitzt eine katalytische Untereinheit (p110) sowie jeweils eine regulatorische Untereinheit (p85) (93,97). Die regulatorische Untereinheit wird durch Phosphorylierung der RTKs aktiviert (98). Der PI3K Signalweg kann zudem durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden (99) Es wird zudem diskutiert, dass auch das Ras-Onkogen an der Aktivierung beteiligt ist (100). Die aktivierte PI3K wandelt durch Phosphorylierung Phosphatidylinositol-4,5 Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) um (101).

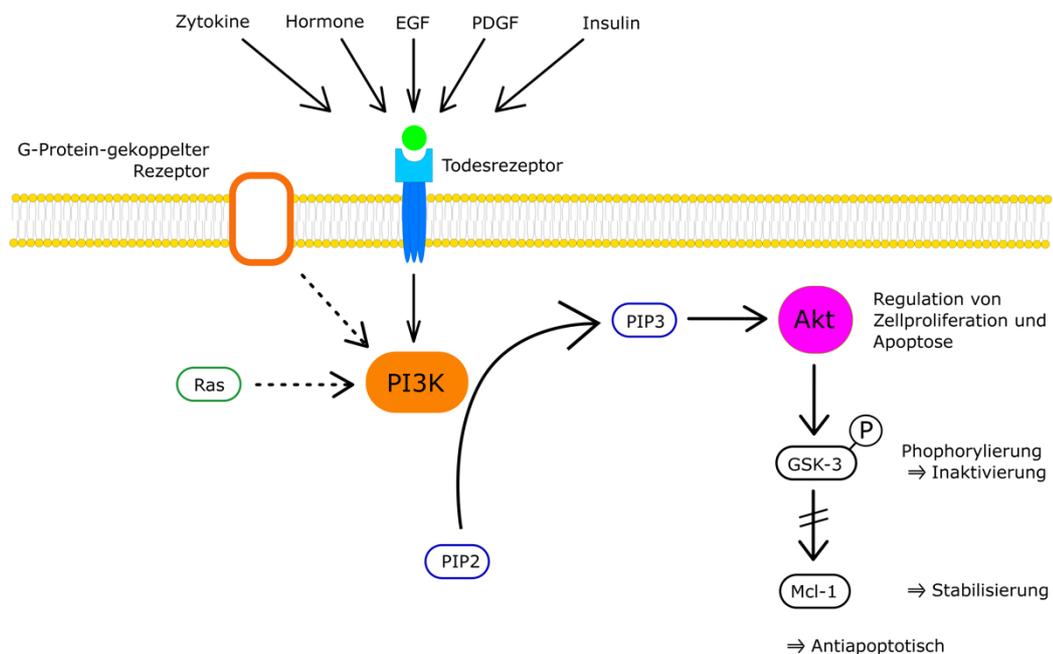


Abbildung 3 | Schematische Darstellung der PI3K Signalkaskade. Antiapoptische Funktion der PI3K unter anderem über Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1

PIP₃ fungiert als second messenger und rekrutiert Proteine an die Zellmembran, die eine *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne besitzen (102). Zu ihnen zählt die Akt, die auch unter dem Namen Proteinkinase B (PKB) bekannt ist (103). Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase welche durch Phosphorylierung an Threonin³⁰⁸ und Serin⁴⁷³ aktiviert wird (102,104). Im aktivierten Zustand phosphoryliert die Akt wiederum weitere Substrate, die Einfluss auf die Zellproliferation und Regulation des Zellüberlebens nehmen (105). Zum Beispiel inaktiviert Akt durch Phosphorylierung proapoptotisch-wirkende Proteine und fungiert somit antiapoptotisch (105). Außerdem aktiviert sie andere Mediatoren wie Nf-κB, welches wiederum zu einer erhöhten Transkription von antiapoptotischen Proteinen führt (106).

Ein weiteres Protein, durch das Akt das Zellüberleben reguliert, ist die GSK-3. Von der GSK-3 gibt es 2 Isoformen, die GSK-3α und GSK-3β (107). Die GSK3 ist in vielen Signalkaskaden involviert und fungiert sowohl antiapoptotisch sowie proapoptotisch (108). In PMN wird vor allem GSK-3α exprimiert (109). In ruhenden Zellen ist die GSK aktiv, an der Inaktivierung ist auch die PI3K beteiligt (109). Die PI3K phosphoryliert nach Stimulation zunächst Akt, welche wiederum durch Phosphorylierung der GSK-3 an einem Serinrest (Serin 21) zu deren Inaktivierung führt und somit antiapoptotisch wirkt (109,110).

1.3.5 Das antiapoptotische Protein Mcl-1

Mcl-1 wurde erstmals 1993 in humanen, myeloischen Leukämiezellen identifiziert. In diesen Zellen zeigte sich eine verstärkte Expression von Mcl-1 während der Differenzierungsphase (111).

Mcl-1 ist ein Mitglied der Bcl-2 Familie und ist gekennzeichnet durch einen hohen Umsatz im Zellstoffwechsel (68). Es besitzt drei *Bcl-2-homology* (BH)-Domänen, mit denen es Protein-Protein Interaktionen eingehen kann (64). Mcl-1 inhibiert in der Zelle die Apoptose über die Regulation von proapoptotischen Proteinen und fungiert als antiapoptotisches Protein. Es bindet und inhibiert beispielsweise das Protein *truncated BH3 interacting domain death agonist* (tBid) und verhindert dadurch die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium (112). Darüberhinaus bindet es die Proteine Bax und Bak, die ebenfalls an der Porenbildung in der Mitochondrienmembran beteiligt sind und wirkt dadurch der Apoptose entgegen (113). Es gibt Hinweise, dass die Regulation des Proteins auf Transkriptionsebene über Kinasen (P38 MAPK, PI3K/Akt)

erfolgt (114,115) und posttranskriptional über alternatives Splicing (116). Posttranslational erfolgt ein Abbau durch Proteasen (111). Abhängig von der Phosphorylierungsstelle der Aminosäurereste von Mcl-1, kommt es zu einer Zu- oder Abnahme der Stabilität von Mcl-1 (117,118). Die GSK-3 beispielsweise führt durch die Phosphorylierung von Mcl-1 an einem Serinrest zur Abnahme der Stabilität und als Folge zu einer Ubiquitinylierung sowie einem anschließenden Abbau von Mcl-1 im Proteasom (110). Die GSK-3 wiederum wird durch die Phosphorylierung an Serinresten durch Akt inaktiviert, was im Umkehrschluss zu einer verminderten Stabilität von Mcl-1 führt (119). Auch in PMN konnte gezeigt werden, dass die Expression von Mcl-1 mit der Lebensdauer der PMN korreliert. Studien zeigen, dass Zellen nach Stimulation durch GM-CSF gleichzeitig eine Überexpression von Mcl-1 sowie eine verminderte Apoptoserate aufweisen. Auf der anderen Seite konnten niedrige Mcl-1 Level in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (120).

1.3.6 Verzögerte Apoptose in PMN nach Polytrauma

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit generalisierter Inflammation wie Sepsis (121), Verbrennungen (122), ARDS (123) oder rheumatoider Arthritis (124) konnte eine verzögerte Apoptose von PMN gezeigt werden. Auch PMN von Patienten nach Polytrauma weisen eine verlängerte Überlebensrate auf (125). Die verlängerte Überlebensrate der PMN wird durch unterschiedliche Mediatoren vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate von PMN durch bestimmte Zytokine und Chemokine moduliert werden kann. Zu diesen Botenstoffen gehören unter anderen GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-6, IL-15 (126–129). Auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der verlängerten Überlebensdauer von PMN beteiligt (130). Diese Dysregulation im Apoptoseverhalten der PMN nach Polytrauma führt zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren aus den Granula der PMN und einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (131). Die vermehrte Freisetzung der proteolytischen Enzyme und der ROS resultiert in einem zunehmenden Gewebeschaden, der wiederum in einen Organschaden münden kann (132,133). Bei der Prävention eines SIRS bzw. MOVs von Patienten nach Polytrauma könnte eine ausgeglichene Apoptoserate von PMN daher eine besondere Bedeutung zukommen.

2 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war, die Regulation der intrinsischen Apoptose in PMN zu untersuchen und die molekularen, intrazellulären Abläufe nach Polytrauma besser zu verstehen. Es wurden im Rahmen der Arbeit Versuche durchgeführt, die das Serum-vermittelte verlängerte Überleben der PMN nach Polytrauma aufklären sollten. Insbesondere wurde der Einfluss der p38 MAPK und der PI3K auf das Apoptoseverhalten der PMN nach Polytrauma untersucht. Neben dem Einfluss der Kinasen auf das spontane Apoptoseverhalten der PMN wurde der Zusammenhang der Kinasen und der Mcl-1 Stabilität genauer untersucht. Des Weiteren sollte überprüft werden, inwieweit die Kinasen p38 und PI3K an der STS-Resistenz der PMN nach Polytrauma beteiligt sind. Es wurde untersucht, ob die STS-Resistenz und die damit einhergehende Serum-vermittelte verzögerte spontane Apoptose, die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials und die Mcl-1 Stabilität über diese Kinasen moduliert werden. Ergänzend sollte der Einfluss der GSK-3 auf das Apoptoseverhalten und die Expression von Mcl-1 in PMN charakterisiert werden.

3 Material

3.1 Geräte und Zubehör

Beschreibung (Name)	Hersteller	Hauptsitz
Blot-Kammer (Novex Semi-Dry Blotter)	Life Technologies	Carlsbad, USA
Brutschrank (HeraCell 150)	Heraeus	Hanau,DE
ChemiDoc Gel Imaging System	BioRad	Hercules, USA
Dispergiergerät Ultra-Turrax	IKA	Staufen, DE
Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra-Cell	BioRad	Hercules, USA
FACSCalibur	BD Bioscience	Franklin Lakes, USA
Glasplatten für Gele (0,75mm und 1mm)	BioRad	Hercules, USA
Heizplatte dry bath FB15101	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Inkubator (kelvitron t)	Heraeus	Hanau,DE
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss	Oberkochen, DE
Multipipette	Eppendorf	Hamburg, DE
Neubauer Zählkammer	Neubauer	
RT-PCR-Gerät Abiprism 7300	Applied Biosystems	Waltham, USA
Victor Multilable Plate Reader	Perkin Elmer	Waltham, USA
Pipetten (0,5-10ul/10-100ul/100-1000ul)	Eppendorf	Hamburg, DE
Präzisionswaage Adventurer Pro	Ohaus	Parsippany, USA
Semi-Dry Blotter Novex	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Spannungsquelle PowerPac Basic Power Supply	BioRad	Hercules, USA
Spannungsquelle PowerPac HC	BioRad	Hercules, USA
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Ständer/ <i>Casting Stands</i> für Gele	BioRad	Hercules, USA
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Taumel-Rollenmischer RM 5	CAT	Ballrechten-Dottingen, DE
PCR-Gerät Thermocycler	BioRad	Hercules, USA
Protein Blotting System Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad	Hercules, USA
Thermomixer Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, DE
Trennkämme für Gele	BioRad	Hercules, USA
Ultraschallprozessor UP50H mit Sonotrode MS1	Hielscher	Teltow, DE
Zentrifuge FRESCO 17	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus	Hanau, DE

3.2 Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Hersteller	Hauptsitz
Blotting-Filterpapier (Dicke: 2,5 mm)	Life Technologies	Carlsbad, USA
FACS-Rundbodenröhrchen (5ml; 12x75mm)	BD Bioscience	Franklin Lakes, USA
Falcons (15ml und 50ml)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AU
Fiber Pads	BioRad	Hercules, USA
Kombitips (Combitips Plus 0,5 ml und 10 ml)	Eppendorf	Hamburg, DE
Lithium-Heparin Plasmaröhrchen (6ml)	BD	Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatten (12; 24 und 96-Well Platten)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, AU
Nitro-Zellulosemembran (0,2 µm)	BioRad	Hercules, USA

Pasteurpipetten (3 ml)	Ratiolab	Dreieich, DE
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Starlab	Hamburg, DE
Stripetten (10ml und 25ml)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller	Hauptsitz
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Roth	Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
APS	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, DE
BSA	Roth	Karlsruhe, DE
Cellwash	BD Bioscience	Franklin Lakes, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva	Heidelberg, DE
Cycloheximid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
ECL Western Blotting Substrate	Promega	Fitchburg, USA
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Essigsäure (96%)	Merck	Darmstadt, DE
Ethanol	Merck	Darmstadt, DE
Glycerol	Roth	Karlsruhe, DE
Glycin	Roth	Karlsruhe, DE
Isopropanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
JC-1	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Methanol	Merck	Darmstadt, DE
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, DE
NaCl 0,9%	Fresenius	Bad Homburg, DE
Natriumdeoxycholat	Roth	Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat	VWR	Radnor, USA

Nonidet-P40	Biomol	Hamburg, DE
PBS Dulbecco's w/o Mg/Ca	Merck	Darmstadt, DE
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100×)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Percoll	Merck	Darmstadt, DE
PonceauS	Serva	Heidelberg, DE
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems	Waltham, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Proteaseinhibitor cOmplete	Roche	Basel, CH
Proteinmarker Roti-Mark prestained	Roth	Karlsruhe, DE
Reines Wasser DEPC treated water	Life Technologies	Carlsbad, USA
RNase-Inhibitor RiboLock 2500U	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
TEMED	VWR	Radnor, USA
Tris	Roth	Karlsruhe, DE
Tris HCl	Roth	Karlsruhe, DE
Tris-Base	Roth	Karlsruhe, DE
Triton X-100	Roth	Karlsruhe, DE
Trizol TriReagent	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

3.4 Oligonukleotide/ Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Hersteller/ Hauptsitz
Oligo-(dT) ₁₅ -Nukleotide	TTTTTTTTTTTTTTTT	Sigma-Aldrich/ St. Louis, USA
Random-Primer	NNN NNN NNN	Jena Bioscience/ Jena, DE

Mcl-1 forward	CAAGG CATGC TTCGG AAACT	Sigma-Aldrich/ St. Louis, USA
Mcl-1 reverse	GATCA TCACT CGAGA CAACG ATTT	Sigma-Aldrich/ St. Louis, USA
18S forward	CATGG TGACC ACGGG TGAC	Sigma-Aldrich/ St. Louis, USA
18S reverse	TTCCT TGGAT GTGGT AGCCG	Sigma-Aldrich/ St. Louis, USA

3.5 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium

RPMI 1640, 1% Penicillin/Streptomycin+1% FCS. Abhängig vom Versuch wurde entweder 5% FCS oder 5% Serum von Polytrauma-Patienten hinzugegeben. Um Unterschiede zwischen den Seren zu minimieren, wurden jeweils Serum-Pools von mindestens drei Polytrauma-Patienten zusammengestellt

Western Blot

Trenngel-Puffer (4x)

1,5M Tris (pH 8,8), 0,4% SDS, ad 500 ml H₂O

10% Trenngel (1 Gel, pH 8,8)

2,5 ml 30% Acrylamid, 3,125ml H₂O, 1,875ml Trenngelpuffer (4x), 10µl TEMED, 25µl 10% APS

Sammelgel-Puffer (4x)

0,5 M Tris (pH 6,8), 0,4 % SDS, ad 100 ml H₂O

Sammelgel (1 Gel, pH 8,8)

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

Laufpuffer/ Elektrophorese-Puffer (1x)

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

Transfer-Puffer (1x)

12 mM Tris-Base, 96 mM Glycin

Transfer-Puffer (25x)

18,2g Tris-Base, 90g Glycin, ad 500 ml H₂O

Blotting-Puffer (für 2 Gele)

40 ml Transferpuffer (25x), 50 ml Ethanol (10%), ad 500 ml H₂O

Laemmli-Puffer (4x)

250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0,1% Bromphenolblau, ad 10 ml H₂O, 20% β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch hinzugeben)

TBS (1x)

7,7 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, ad 1000 ml H₂O

TBS-T

TBS, 0,1% Tween

Coomassie-Färbelösung

0,25 g Coomassie-Blau (R-250), 10 ml Eisessig (96% Essigsäure), 90 ml Methanol/ H₂O (50 ml Methanol+40 ml H₂O)

Coomassie-Entfärber-Lösung

60 ml Methanol, 20 ml Eisessig, ad 200 ml H₂O

PonceauS-Lösung

0,1% PonceauS, 3% Essigsäure

RIPA-Puffer

50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholat, 0,1% SDS

Blockierungspuffer

5% Magermilchpulver in TBS-T bzw. 5% BSA in TBS-T

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

Bestimmung der Apoptose**Lyse-Lösung für die Erythrozyten**

0,83% Ammoniumchlorid (NH_4Cl), 0,1% Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO_3), 0,004% EDTA

Propidiumiodid-Lösung (Nicoletti-Puffer)

0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100, 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid

JC-1 Färbelösung (760 μM)

7,6 mM JC-1 in PBS

3.6 Inhibitoren

Bezeichnung	Produkt-Name	Hersteller/ Hauptsitz
P38-Inhibitor	SB203580	Cayman Chemicals/ Ann Arbor, USA
PI3K-Inhibitor	LY294002	Cayman Chemicals/ Ann Arbor, USA
GSK-3 Inhibitor	CHIR-98014	Axon Medchem/ Reston, USA

3.7 Antikörper

Name	Hersteller	Hauptsitz
Maus anti-human Mcl-1 Antikörper (monoklonal)	BD Bioscience/ # 559027	Franklin Lakes, USA
Maus anti-human GAPDH Antikörper (monoklonal)	Biomol/ # IMG-5019A-1	Hamburg, DE
Ziege anti-Maus-HRP(<i>anti-horseradish peroxidase</i>) Immunglobulin (polyklonal)	Dako / # P0447	Santa Clara, USA

3.8 Kits

Name	Hersteller	Hauptsitz
Clarity Western ECL Substrate	BioRad	Hercules, USA
DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Omniscript RT Kit (200)	Qiagen	Hilden, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Roti-Mark Western-Set	Roth	Karlsruhe, DE

3.9 Software/ Programme

Name	Hersteller	Hauptsitz
ABI Prism 7300	Applied Biosystems	Waltham, USA
CellQuestPro	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software, Inc.	San Diego, USA
QuantityOne 4.6.5 Basic	Bio Rad	Hercules, USA
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio Rad	Hercules, USA

Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason Universität	Fairfax, USA
Microsoft Word für Mac; Version 15.24	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Inkscape 0.91	Inkscape Community	
Adobe illustrator	Adobe Systems	Delaware, USA

3.10 Aufnahmekriterien der Patienten in die Studie

Für die Versuche dieser Arbeit wurde Serum von Patienten nach Polytrauma verwendet. Die Proben stammen von insgesamt 37 Patienten (11 Frauen und 26 Männer). Das Durchschnittsalter betrug $52,4 \pm 19,2$ Jahre. Die Serumproben wurden ab Tag 1 nach Polytrauma aus einem arteriellen Verweilkatheter entnommen und 10 min bei 3000 rpm bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorf-Behälter überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Einschlusskriterien der Patienten waren ein *injury severity score* (ISS) von ≥ 16 und Aufenthalt auf der Intensivstation ≥ 3 Tage. Patienten mit isolierten Schädelhirntrauma und Patienten unter immunsuppressiver Medikation wurden von der Studie ausgeschlossen.

Des Weiteren erfüllten alle Patienten mindestens zwei der Kriterien eines SIRS.

Die Studie wurde im Voraus der Ethikkommission vorgestellt und genehmigt. (Ethikantragsnummer: 3412)

Für die Versuche wurden Pools aus mindestens drei Patienten-Seren hergestellt, um Abweichungen zwischen den Seren zu minimieren. Im Folgenden wird an Stelle von *Pool aus mindestens drei Polytrauma-Patienten-Seren* der Begriff *Polytrauma-Serum* oder *Patienten-Serum* verwendet.

4 Methoden

4.1 Isolierung von PMN aus humanem Vollblut

Für die Gewinnung der PMN wurde peripheres, venöses Blut gesunder Probanden in Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen. Um die PMN aus dem Vollblut zu isolieren, wurde ein Percoll-Gradient mit einer Dichte von 1,086 aus 5ml Percoll (Dichte: 1,124 g/ml) und 3,4ml 0,9% NaCl hergestellt, in 15 ml Falcons überführt und mit jeweils 5 ml des entnommenen Blutes überschichtet. Die Proben wurden bei 2000 rpm für 25 min ohne Bremse bei RT abzentrifugiert. Durch diesen Vorgang konnten die Zellen in vier unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt werden (in aufsteigender Reihenfolge): Ein Pellet bestehend aus Erythrozyten und PMN, eine Schicht mit der Percoll-Lösung, eine Schicht aus mononukleären Zellen und eine obere Plasma-haltige Schicht.

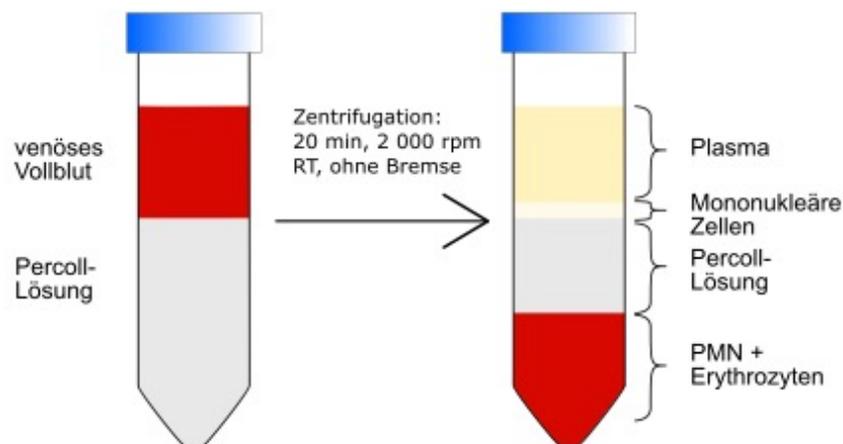


Abbildung 4 | Schematische Darstellung der Isolation von PMN aus humanem Vollblut. Das venöse Blut wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen und auf eine Percoll-Lösung pipettiert. Die Probe wurde 20 min bei 2000 rpm bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation zeigte sich ein Gradient aus 4 Schichten (

Die Fraktionen über dem Pellet wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden vorsichtig in 5ml einer ammoniumchloridhaltigen Lyse-Lösung für Erythrozyten resuspendiert, in 50 ml Falcons überführt und mit weiteren 45 ml der Lyse-Lösung aufgefüllt. Die Falcons mit den in Lyse-Lösung

resuspendierten Zellen wurden für 7 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 min bei 17°C setzten sich die PMN als Pellet am Boden der Falcons ab. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 5ml PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte direkt im Anschluss.

4.2 Zellzahl-Bestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl der PMN wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,100 mm sowie 3 mal 3 Eckquadrate a 1mm² verwendet. Es erfolgte eine Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:4 und wovon 10 µl zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer pipettiert wurden. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der durch Zellen aufgenommen wird. Von vitalen Zellen wird der Farbstoff wieder nach extrazellulär transportiert ~~wird~~, wohingegen die nicht-vitalen Zellen den Farbstoff aufnehmen und dadurch unter dem Mikroskop blau erscheinen. Es folgte eine Zählung der hell-erscheinenden, vitalen Zellen in jeweils 4 Großquadraten. Die Zellzahl wurde an Hand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} / 4 (\text{Anzahl der Großquadrate}) \times 4 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

4.3 Kultivierung von humanen PMN

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI-1640 + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% FCS. Nach Zellzahlbestimmung wurden 2,5-3×10⁶ Zellen pro ml in 8- bzw. 24-Well-Platten ausgesät und für definierte Zeitpunkte kultiviert. Für die Versuchsreihe mit Patienten-Serum wurden Pools aus mindestens 3 Seren hergestellt und zu je 5% zu den Zellen gegeben. Die Kontrollen wurden mit jeweils 5% FCS versetzt.

4.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate

4.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können physikalische und molekulare Eigenschaften von Zellen bestimmt werden. Man nutzt die Streueigenschaften eines Argon Lasers, welcher abhängig von der Zellgröße und der Zellgranularität in unterschiedliche Richtungen gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*= *FSC*) bezeichnet das Streulicht, das durch die Ablenkung des Lasers durch Eintreffen auf die Zellmembran entsteht. In Richtung des Lasers wird das gestreute Licht durch einen Detektor gemessen und in Spannungssignal umgewandelt. Hierdurch kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Je breiter die Streuung, desto größer ist die Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (*side Scatter*= *SSC*) misst die Streuung des einfallenden Laserstrahls, der durch die Ablenkung des Strahls durch die Zellorganellen entsteht. Er dient zur Charakterisierung der Granularität der einzelnen Zellen. Je höher die Granularität, desto größer ist die Streuung. Mit Hilfe dieser Eigenschaften lassen sich mittels FACS die Zellen nach ihren Eigenschaften bestimmen. Des Weiteren können Zellen mit bestimmten fluoreszierenden Farbstoffen behandelt werden. Jeder Farbstoff bindet an unterschiedliche Zellbestandteile und hat charakteristische Absorptions- und Emissionseigenschaften die über die unterschiedlichen Kanäle des FACS-Gerätes gemessen werden können.

4.4.2 Bestimmung der Apoptoserate nach der Methode von Nicoletti

Die Apoptoserate der PMN kann durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid (PI) detektiert werden. Diese Methode wurde durch die Arbeitsgruppe um Ildo Nicoletti 1991 erstmals beschrieben und publiziert (134). PI ist ein Fluorochrom, das an doppelsträngige DNA zwischen den Basenpaaren interkaliert. Bei der Apoptose kommt es typischerweise zu einer Auflösung der Zellkernmembran und einer Fragmentierung der DNA (47). Durch Triton-X 100, welches im Nicoletti-Puffer enthalten ist, wird die Zellmembran lysiert, die Kernmembran bleibt durch diesen Vorgang hingegen intakt. Der Farbstoff gelangt in die Zellen und bindet an die DNA, wobei fragmentierte DNA weniger Farbstoff anlagert. Die schwächere Fluoreszenz der fragmentierten DNA wird schließlich in der FACS-Messung in Form eines sog. sub-G1-Peaks ersichtlich. Dieser

entspricht folglich dem Anteil an fragmentierter DNA welcher durch die FACS-Analyse quantifiziert werden kann.

Um die Apoptose nach 18h zu messen, wurden die PMN (mindestens 10^5) aus den einzelnen Wells nach jeweiliger Behandlung in FACS-Tubes überführt und bei 4500 rpm 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zu den Zellen jeweils 200 μ l Nicoletti-Puffer hinzugegeben und für 1h bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Die Erfassung der Fluoreszenz mittels FACS erfolgte bei einer Wellenlänge von 585nm entsprechend des Emissionsmaximums von PI über den Kanal 2 (Fl-2).

4.4.3 Bestimmung der frühen Apoptose durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP)

Intakte Mitochondrien sind im Inneren stark negativ geladen. Wird eine Zelle apoptotisch, kommt es in der Anfangsphase zunächst zu einer Porenbildung in der Mitochondrienmembran. Hieraus folgt, dass sich die negative Ladung im Inneren der Mitochondrien in Richtung positiveren Zuständen verschiebt. Das Innere des Mitochondriums wird folglich weniger negativ. Dies kann durch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) bestimmt werden und beschreibt die frühe Phase der Apoptose der Zellen (135,136)

Mittels JC-1 Färbung kann das MMP bestimmt werden. JC-1 ist ein membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der bei intakten Mitochondrien in deren Inneren rot-fluoreszierende Aggregate (J-Aggregate) bildet. In der Phase der frühen Apoptose hingegen bleibt JC-1 als grün-fluoreszierendes Monomer im Zytoplasma zurück. Die unterschiedlichen Fluoreszenzen können durchflusszytometrisch abhängig ihrer charakteristischen Emissionsverhalten bestimmt werden.

Um das MMP zu bestimmen, wurde zu den PMN (mindestens $2,5 \times 10^5$ Zellen) 3 μ M JC-1-Lösung hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde zuletzt in 500 μ l PBS aufgenommen und es wurde unmittelbar danach die Fluoreszenzmessung mit dem FACS-Gerät durchgeführt. Der Farbstoff wurde mit einem Laserlicht von 488 nm Wellenlänge angeregt, die Emission des grün-fluoreszierenden Farbstoffes bei 530 nm (FL 1) und des rot-fluoreszierenden bei einer Wellenlänge von 590 nm (FL 2) bestimmt. Es wurde das Verhältnis $FL-2/FL-1 = \text{rot-fluoreszierend/grün-fluoreszierend}$ errechnet, welches in apoptotischen Zellen abnimmt.

4.5 Bestimmung der Genexpression

4.5.1 Probenvorbereitung und Isolierung der RNA

Um die RNA aus den PMN zu isolieren, wurde Trizol verwendet. Trizol ist ein monophasisches Reagenz aus Guanidium-thiocyanat sowie saurem Phenol, das u.a. RNA aus Zellen herauslöst. Zu $5-10 \times 10^6$ Zellen wurden jeweils 1 ml Trizol hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren lysiert.

Die Proben wurden für 5 min bei RT inkubiert. Zu jeder Probe wurde jeweils 200 μ l Chloroform hinzugegeben, 15 s kräftig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden bei 11 200 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert.

Durch die Zentrifugation konnten die Proben in unterschiedliche Phasen aufgetrennt werden: In eine obere, wässrige RNA-haltige Phase, eine DNA-haltige Interphase, sowie eine untere Phenol-Chloroform-Phase.

Die obere, wässrige Phase mit der RNA wurde vorsichtig abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, pro Gefäß 500 μ l Isopropanol hinzugefügt, gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Die Proben wurden bei 11 200 rpm 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, die RNA-Präzipitate (Pellets) zweimal hintereinander mit je 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 7 min bei 8 800 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Um das Ethanol verdampfen zu lassen, wurden die Reaktionsgefäße für ca. 5-10 min bei RT offen stehen gelassen. Zu den Pellets wurde 20 μ l steriles RNase-freies H₂O hinzugegeben und die RNA darin resuspendiert.

Um eine mögliche Kontamination der Proben mit DNA auszuschließen bzw. zu beseitigen wurde ein DNase Verdau mit einem Kit durchgeführt. Hierfür wurde 2 μ l eines DNase Puffers sowie 1 μ l rDNase hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 20-30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde ein DNase Inactivation Reagent hinzugefügt für 2 min bei RT inkubiert, sowie währenddessen gelegentlich gemischt. Nach Zentrifugation bei 10 000 rpm für 1,5 min bei RT wurde die RNA in frische Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppis) überführt.

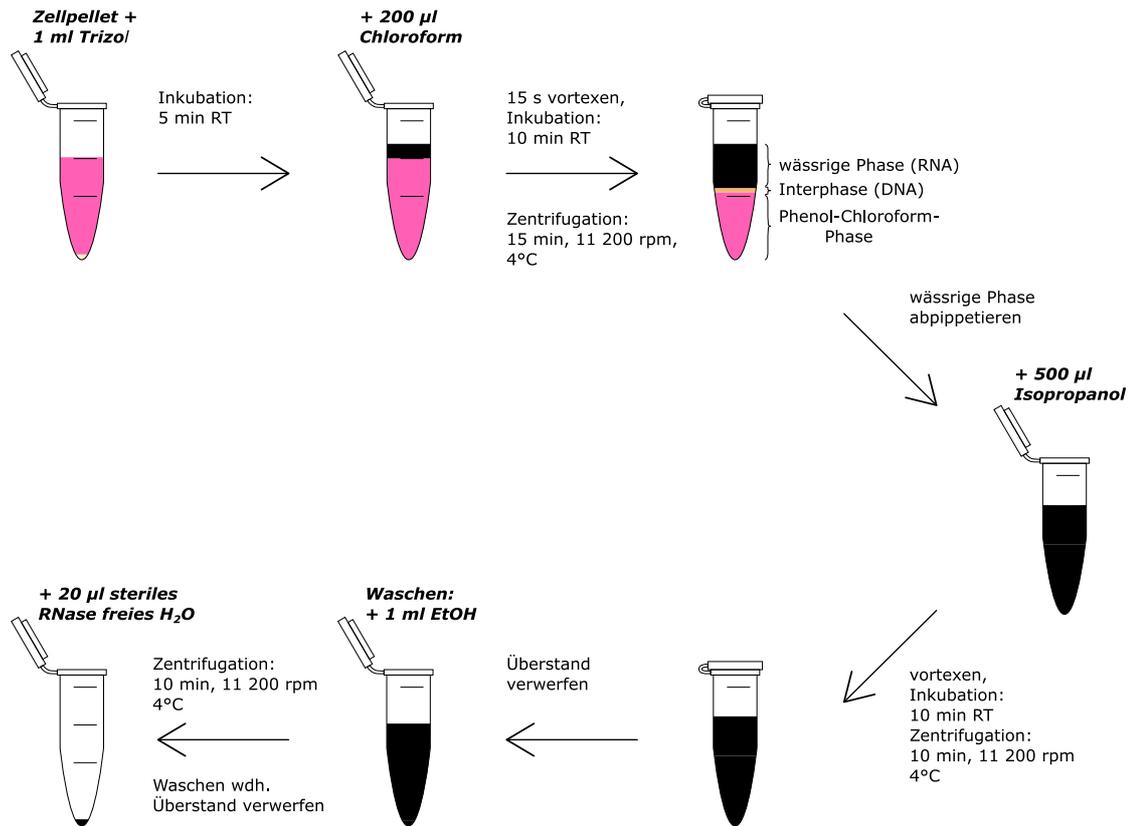


Abbildung 5 | RNA-Extraktion mittels Trizol

4.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die quantitative Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ein Nanodrop 1000 Spektrophotometer verwendet. Um die Reinheit von RNA zu messen, wurde der Quotient aus der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Der Quotient (A_{260}/A_{280}) beschreibt die Reinheit der RNA und liegt bei reiner RNA bei 1,8~2,0. Für die Versuche wurde RNA mit einem Absorptionsquotienten von $>1,7$ benutzt. Um die RNA zu quantifizieren, wurden die Proben in einem Verhältnis 1:50 (2 µl Probe : 98 µl H₂O) verdünnt.

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times 50 \text{ (Verdünnungsfaktor) (ng/}\mu\text{l bzw. }\mu\text{g/ml)}$$

Die Zahl 40 stellt einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht und ungefähr 40 ng/µl RNA enthält.

4.5.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist eine Methode, bei der mit Hilfe von Enzymen einsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird (137,138). Dieser Schritt ist nötig, da das Enzym Taq-Polymerase für die Vervielfältigung des Erbguts nur DNA als Substrat erkennt.

Vor Beginn der Reversen Transkription wurden je 0,5 µl der RNA mit 10 µl reinem H₂O verdünnt (=0,05µg/µl). Pro 10 µl der verdünnten RNA wurde 10 µl eines Mastermix hinzugegeben.

Zusammensetzung Mastermix (für 10 µl)

Bezeichnung	Endkonzentration	Volumen
RT-Puffer (10x),	1x	2 µl
dNTP mix	5 mM	2 µl
Oligo dT	20 µM	1 µl
Random Primers (8bp; 100 µM)	10 µM	2
RNase Inhibitor (40U/µl),	10 U	0,25 µl
Omniscript Reverse Transkriptase (4 U/ µl),	1 U	0,25 µl
RNase-freies Wasser		2,5 µl

Durch die Zusammensetzung der 10 µl der verdünnten Probe mit den 10 µl Mastermix ergab sich eine Endkonzentration der RNA von 25 ng/µl (0,5 µg RNA/20 µl).

Die Proben wurden gemischt und abzentrifugiert und bei konstanten 37 °C für 60 Minuten in einem Thermocycler inkubiert. Die Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

4.5.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT PCR)

Die qRT PCR, welche auf der in den 80er Jahren erstmals beschriebene PCR basiert (139), stellt ein etabliertes und schnelles Verfahren zum Nachweis der Genexpression in Zellen in Echtzeit dar. Die Besonderheit der qRT PCR ist es, dass das Amplifikat nach jedem Zyklus direkt nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Die Quantifizierung erfolgt fluoreszenzbasiert, das heißt, dass die Menge der Produkte während der exponentiellen Phase mittels Fluoreszenzfarbstoff gemessen werden kann.

Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR Green, ein monomerer Farbstoff, der an doppelsträngige DNA interkaliert (140). SYBR Green hat eine bestimmte Grundfluoreszenz, bindet im Laufe der Kettenreaktion an doppelsträngige DNA und ab einem bestimmten Schwellenwert (*threshold*) steigt die Fluoreszenz über die Grundfluoreszenz des Farbstoffes an. Diese messbare Fluoreszenz ist proportional zur Menge des amplifizierten Produktes. Der Ct-Wert ist definiert als die Anzahl an Zyklen, die benötigt werden um den Schwellenwert zu überschreiten.

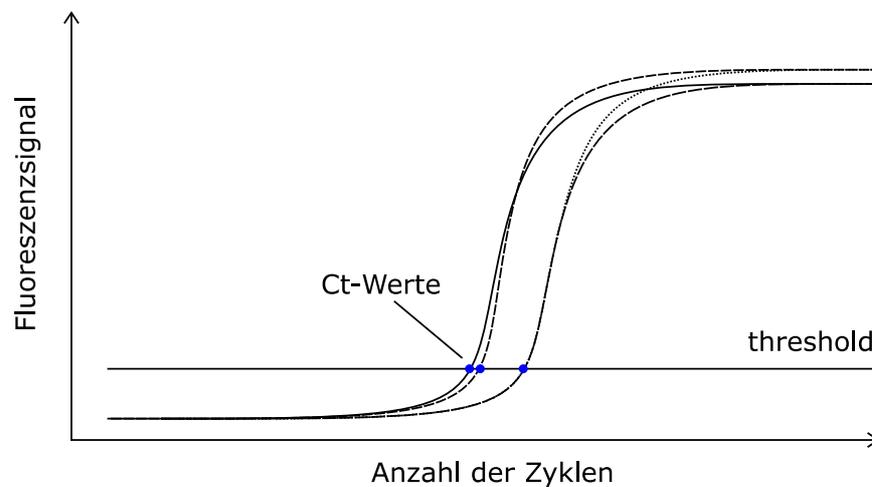


Abbildung 6 |S PCR Amplifikationskurven

Als Referenzgen für die Quantifizierung diente ribosomale RNA 18 S (rRNA 18S), ein *housekeeping gene*, das nicht reguliert ist und unter allen Bedingungen eine konstante Kopienzahl zeigt.

Für die Durchführung der qRT PCR wurde standardmäßig 4 μ l cDNA (2 ng) verdünnt mit 16 μ l H₂O eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 2ng (0,5 ng/ μ l) cDNA.). Die Proben wurden jeweils in Triplets auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Kontrolle dienten pro untersuchtem Gen *non template controls* (NTC) mit dem selben Volumen H₂O an Stelle von cDNA. Zu jeder Probe wurde ein Mastermix hinzugefügt.

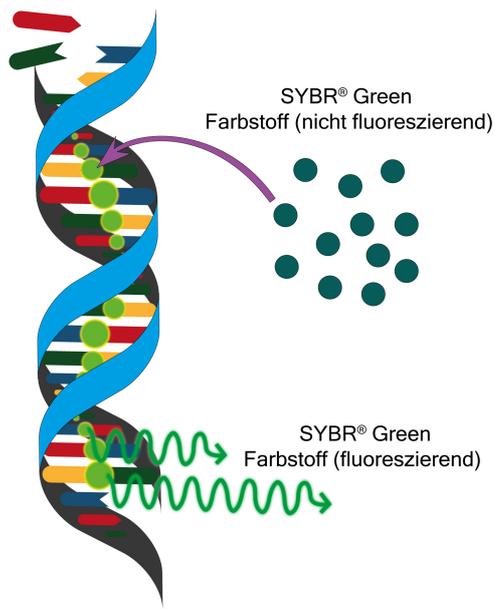


Abbildung 7 | Bindung von SYBR Green an DNA. Nach Bindung von SYBR Green an doppelsträngige DNA, fluoresziert der Farbstoff und kann gemessen werden (modifiziert nach Zhang et al.(141)).

Mastermix für das Zielgen Mcl-1 pro Probe (4 μ l):

12,5 μ l SYBR Green (2x), 0,75 μ l (10 μ M) Primer F(forward) ,0,75 μ l (10 μ M), Primer R (reverse) 7 μ l RNase DNase *free water*.

Mastermix für das Referenzgen 18 S pro Probe (4 μ l): 12,5 μ l SYBR Green (2x), 0,25 μ l (10 μ M), Primer F (forward) 0,25 μ l (10 μ M), Primer R (reverse) 5 μ l RNase DNase *free water*.

Die Proben wurden nach Hinzugabe des Mastermixes bei 1000 rpm für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die qRT PCR erfolgte in folgenden Schritten:

1. Aktivierung der Taq-Polymerase (10 Minuten bei 95°C für 1 Zyklus)
2. Amplifikation (40 Zyklen)
 - a. Denaturierung (15 Sekunden bei 95 °C)
 - b. *Annealing* und *Extension* (60 Sekunden bei 60 °C)

Die zunehmende Fluoreszenz kann durch das PCR-Gerät direkt nach jedem Zyklus gemessen und an das System weitergeleitet werden. Im Anschluss erfolgte eine relative Quantifizierung der gemessenen Werte unter Anwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Hierbei wird zunächst der Ct-Wert des Referenzgens 18S (housekeeping gene) von dem Ct-Wert des Zielgens abgezogen. Dadurch erhält man den Δ Ct-Wert. Der $\Delta\Delta$ Ct-Wert entspricht der Differenz zwischen dem Δ Ct-Wert der Kontrolle jeweils zu den

behandelten Proben. Der relative Expressionsunterschied der Kontrolle und den behandelten Proben ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (142).

4.6 Proteomische Analysen

4.6.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinisolierung, wurden die Proben in einem RIPA-Puffer gelöst und anschließend mit einem Ultraschallprozessor sonifiziert (Amplitude 80 %, Zyklen 0,5). Zur Bestimmung der genauen Proteinkonzentration wurde ein Bicinchoninsäure-Assay Kit (*BCA-assay*) verwendet. Diese Methode beruht auf zwei chemischen Reaktionen. Zum einen kommt es zu der Biuret-Reaktion, bei der Peptidbindungen mit Cu^{2+} zu Cu^+ Ionen unter alkalischen Bedingungen reduziert werden (143). Das reduzierte Kupfer bildet in einem weiteren Schritt einen Farbkomplex mit Bicinchoninsäure, der bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann (144).

Die Proben wurden 1:6 mit PBS verdünnt und jeweils in Dupletts auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Ergänzend wurde ein Standard (0,0125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2 mg BSA/ml PBS) verwendet, der ebenfalls in doppeltem Ansatz auf die Well-Platte pipettiert wurde. Zu jedem Well (Probe und Standard) wurden 200 μl Reagenz (*BCA working reagent*) hinzugegeben. Die Platte wurde für 30 Sekunden bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Photometer (Victor) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Die Proben wurden entweder in RIPA-Puffer bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiter bearbeitet.

4.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter Elektrophorese versteht man die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe. Die Besonderheit der SDS-PAGE ist es, dass die Proteine im selben Prozess denaturiert werden, so dass alle Proteinen nur in ihrer Primärstruktur (nicht gefaltete Struktur) vorliegen. Hierdurch ist es möglich, die Größe der einzelnen Proteine exakter zu bestimmen.

Zur Vorbereitung des Western Blots mussten zunächst Gele gegossen werden. Da die zu untersuchenden Proteine eine Größe von 10-60 kDa aufweisen, wurde ein 10%iges Trenngel hergestellt. Nach Zusammenbau der Apparatur (*Casting Stands, Casting Frames, Glasplatten*) wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert. Bei der Zubereitung des Trenngels startet nach Hinzugabe von APS der Polymerisationsprozess. Das Trenngel wurde bis 2/3 der Glasplatten horizontal hineinpipettiert und direkt mit 70% Ethanol überschichtet. Nach Abschließen des Polymerisationsprozesses (nach ca. 20 min) wurde das Ethanol abgegossen und das Trenngel mit einem 4%igem Sammelgel überschichtet.

Zu den Proben wurde ein SDS- sowie β -mercaptohaltiger Laemmli-Puffer gegeben und für 7 Minuten bei 95°C in einem Heizblock erhitzt. β -Mercaptoethanol führt zu einer Reduzierung der Disulfidbindungen. SDS ist eine anionische Detergenz, welches zur Denaturierung von Proteinen führt. Es überlagert die Eigenladung von Proteinen und lädt diese negativ auf. Dadurch lassen sich denaturierte, negativ geladene Proteine der Größe nach in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auftrennen (145,146).

Die Proben wurden in die Taschen der Sammelgele gegeben. In die erste Tasche der Gele wurde jeweils ein Protein-Marker für die Bestimmung des Molekulargewichts pipettiert. In einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer wurden die Gele einer Spannung von 60 V ausgesetzt. Nach dem Passieren der Proben durch das Sammelgel wurde die Spannung auf 120 V erhöht und dadurch aufgetrennt.

4.6.3 Transfer

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf Grund der negativen Ladung der Proteine können sie in einem elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Die Membran wurde mit Transferpuffer/10% Methanol benetzt und das Gel darauf platziert. Die Blasen zwischen Gel und Membran wurde vorsichtig entfernt. Das Membran/Gel Konstrukt wurde von innen mit Transferpuffer getränktes Blotting-Papier ummantelt (Schwamm-Schwamm-Gel-Membran-Schwamm- Schwamm) und in einer Blotkammer einer Spannung von 23 V für 1,5 Stunden für den Transfer ausgesetzt.

Um die Effizienz des Transfers vom Gel auf die Membran zu überprüfen, wurde PonceauS verwendet. PonceauS ist ein Azofarbstoff, der Proteine auf der Membran

unspezifisch und reversibel anfärbt. PonceauS wurde nach Anfärben der Banden vollständig mit H₂O bzw. TBS-T ausgewaschen.

4.6.4 Immundetektion

4.6.4.1 Immundetektion von Mcl-1

Um unerwünschte Reaktionen bei der folgenden Immundetektion zwischen der Membran und den Antikörpern zu vermeiden, wurde die Membran auf dem Schüttler bei RT für 1 h mit TBS-T + 5% Milchpulver geblockt.

Die Membran wurde mit dem ersten Antikörper (monoklonalen Antikörper Maus anti-human Mcl-1 Antikörper) in einer 1:300 Verdünnung mit 1% Milchpulver in TBS-T für 2,5 Stunden auf dem Roller bei RT inkubiert und dreimalig für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen.

Für die Detektion des primären Antikörpers diente ein HRP (*horeship peroxidase*; Merrettichperoxidase)-gekoppelter Anti-Maus Zweitantikörper. Die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T bei RT für 1 h.

Nach erneutem Waschen (3×5 min in TBS-T) konnte das Signal mittels Chemilumineszenz visualisiert werden. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines Luminol-haltigen Kits. In Anwesenheit von Peroxidase wird Luminol durch die HRP oxidiert und emittiert dadurch Licht, welches detektiert werden kann. Die Intensität des Lichtes korreliert mit der Menge des Proteins und kann durch ein entsprechendes Programm (QuantityOne Basic) quantifiziert werden.

4.6.4.2 Stripping

Um die gebundenen Antikörper von der Membran zu lösen wurde die Membran gestrippt. Die Membran wurde in einem β -mercaptoethanol-sowie SDS-haltigem Puffer (Stripping-Buffer) bei 60°C im Wasserbad für 20 min geschüttelt. Es folgte eine gründliches Waschen der Membran mit PBS (5x 10 min).

4.6.4.3 Immundetektion von GAPDH

Vor Behandlung mit dem Kontroll-Antikörper wurde die Membran mit 5% BSA in TBS-T für 1 h bei RT geblockt.

Zur Quantifizierung der Mcl-1 Proteinexpression wurde ein anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Antikörper verwendet. Hierfür wurde die Membran zusammen mit dem anti-GAPDH-Antikörper in einer Verdünnung von 1:7500 in 3% BSA + TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in TBS-T (3x5 min) gewaschen. Für die Detektion von GAPDH wurde ebenfalls der Ziege anti-Maus HRP Zweitantikörper verwendet. Die Membran wurde mit dem Zweitantikörper in einer Verdünnung in TBS-T von 1:1000 bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Die Visualisierung der Chemilumineszenz erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Luminol-haltigen Kits.

4.6.5 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten wurden mit GraphPad Prism (Version 5) ausgewertet. Hierfür wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Als Post-hoc-Test wurde falls nicht anders vermerkt der Newman-Keuls Test angewendet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei $P < 0.05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Studienkonzept und Versuchsaufbau

PMN von Patienten nach Polytrauma weisen ein verlängertes Überleben auf. Vorarbeiten unserer sowie anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die PMN gesunder Probanden nach Behandlung mit isoliertem Plasma von Polytrauma-Patienten ebenfalls eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (PMN gesunder Probanden) aufweisen. Die PMN gesunder Probanden zeigen also in Anwesenheit von Polytrauma-Serum ähnliches Apoptoseverhalten wie die PMN der Polytrauma-Patienten selber was in Vorarbeiten gezeigt werden konnte (88,147). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach gezielter Inhibition der PI3K sowie der P38 das spontane Apoptoseverhalten, sowie der Einfluss der Kinasen auf die Expression von Mcl-1 und die Beteiligung der Kinasen an der STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma untersucht.

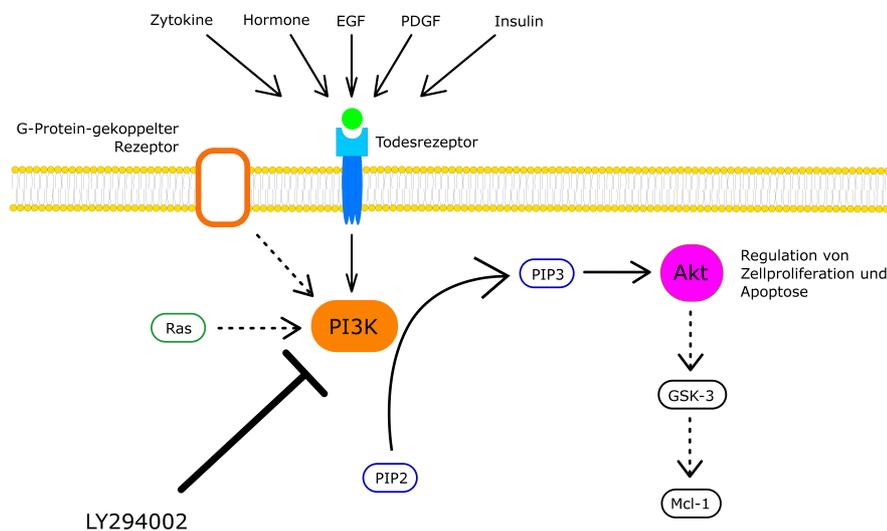


Abbildung 9 | Versuchsbeschreibung- Inhibition der PI3K

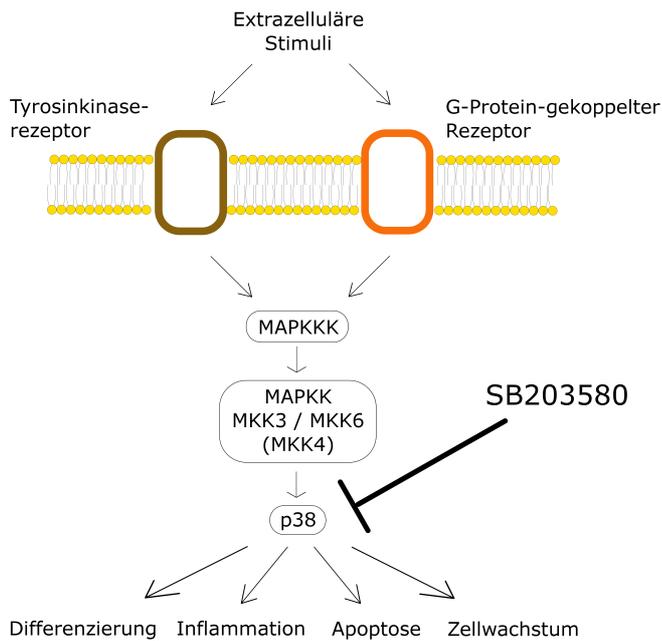


Abbildung 8 | Versuchsbeschreibung- Inhibition der p38

5.2 Der Effekt der p38- bzw. PI3K-Inhibition auf die spontane Apoptose von PMN nach Stimulation mit Serum von Polytrauma-Patienten

Die Beteiligung der p38 MAPK und der PI3K an der Vermittlung der Apoptose-Resistenz von PMN sollte durch spezifische Kinaseinhibitoren aufgeklärt werden. Es wurden PMN gesunder Probanden isoliert, in RPMI + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% FCS resuspendiert und steril zu je 1 ml mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ in 24-Well-Platten pipettiert. Die Inhibition der p38 MAPK erfolgte mit dem Kinase-Inhibitor SB203580 (40 μ M). Die Inhibition von PI3K erfolgte mit dem Kinase-Inhibitor LY294002 (25 μ M). Weitere Zellen wurden außerdem mit beiden Inhibitoren (40 μ M SB203580 + 10 μ M LY294002) simultan behandelt. Nach Zugabe der Inhibitoren wurde nach 20 min Inkubationszeit 5% Serum von Polytrauma-Patienten bzw. als Kontrollgruppe 5% FCS zu den Zellen gegeben. Nach 18h wurde die spontane Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt. Die Inhibition der Kinasen alleine (SB203580 bzw. LY294002), sowie nach simultaner Inhibition (SB203580+LY294002) in An- als auch in Abwesenheit von Patienten-Serum führt zu einer Zunahme der

Apoptose in den PMN. Der Effekt lässt sich am deutlichsten bei den mit Serum behandelten PMN nach Inhibition der PI3K alleine und der Inhibition beider Kinasen simultan feststellen, hier führte die Inhibition jeweils zu einer 2-fach signifikanten Zunahme der Apoptose, durch die Inhibition beider Kinasen konnte der Serumvermittelte antiapoptotische Effekt vollständig aufgehoben werden. Durch Inhibition der p38 alleine kam es demgegenüber zu keiner signifikanten Zunahme der Apoptose (Abb. 10).

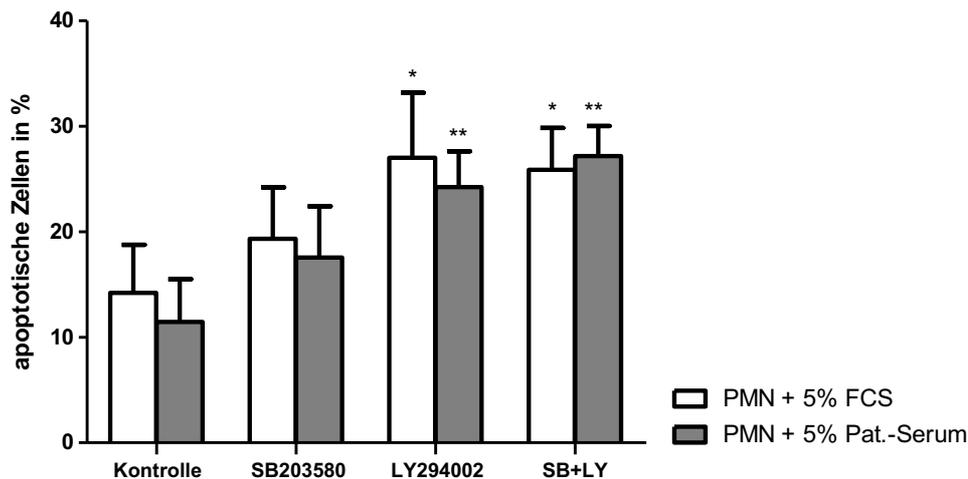


Abbildung 10 | Die spontane Apoptoserate von PMN nach Inhibition der P38 sowie der PI3K in An- bzw. Abwesenheit von Serum von Polytrauma-Patienten. PMN gesunder Probanden wurden isoliert, in Medium aufgenommen und für 20 min jeweils mit 40µM SB203580 (Inhibitor von p38), 25 µM LY294002 (Inhibitor von PI3K) sowie in Kombination mit 40 µM SB203580 + 10 µM LY294002 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5% FCS bzw. 5% Serum-Pool von Patienten nach Polytrauma versetzt. Nach 18h Inkubation wurde die Apoptose mit PI durchflusszytometrisch bestimmt. Es ist jeweils der prozentuale Anteil der Zellen mit einem sub-G1 Peak dargestellt. (*p<0,05; **p<0,005) *beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (PMN 5% FCS bzw. PMN 5% Polytrauma-Serum) n=5

5.3 Der Effekt der p38-bzw. PI3K-Inhibition auf die Mcl-1 mRNA-Expression

Weitere Versuche sollten den Einfluss der Kinasen p38 und PI3K auf die Serumvermittelte Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 auf Genebene klären. Die PMN gesunder Probanden wurden nach Isolierung mit den Kinaseinhibitoren sowie mit 5% FCS bzw. 5% Polytrauma-Serum wie im vorausgegangenen Versuch behandelt und für 4h bzw. 18h kultiviert.

In den Kontroll-PMN, die mit Patienten-Serum behandelt wurden, zeigten sich nach 4h eine nicht signifikante Erhöhung der Mcl-1 mRNA-Expression gegenüber den Kontroll-PMN ohne Serum (Abb. 11A). Die PMN zeigten nach Inhibition der Kinasen alleine, sowie nach simultaner Inhibition jeweils leicht erhöhte Mcl-1 Genexpressionen nach 4h (Abb. 11A). Die Abbildung 11B beschreibt die Mcl-1 mRNA-Expression nach 18h. Es lassen sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den mit Serum behandelten PMN im Vergleich zu den unbehandelten PMN bezgl. der Mcl-1 mRNA-Expression feststellen. Nach 18 h Inkubation mit SB203580 sowie beide Inhibitoren in Kombination kam es in der Gruppe der PMN in An- und in Abwesenheit von Patienten-Serum zu einer signifikanten Abnahme der Mcl-1 mRNA-Expression, die Inhibition von PI3K hingegen führte nur zu einer leicht verminderten Mcl-1 Genexpression. (Abb. 11B).

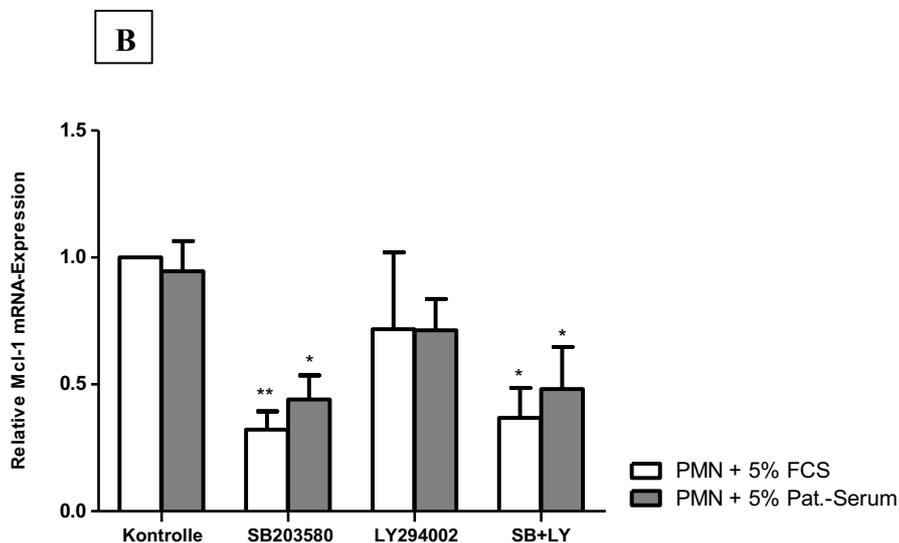
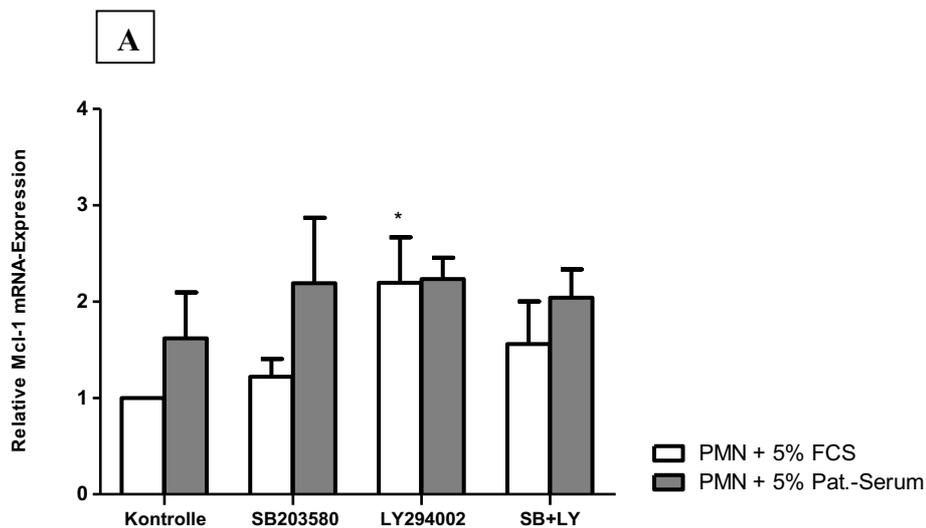


Abbildung 11 | Die Expression von Mcl-1 mRNA in PMN nach Inhibition der p38 sowie der PI3K in An- und Abwesenheit von Serum von Polytrauma-Patienten nach 4h (A) bzw. 18h (B). PMN gesunder Probanden wurden isoliert, in RPMI+1% P/S+1% FCS aufgenommen und für 20 min mit 40 μ M SB203580 (Inhibitor von p38), 25 μ M LY294002 (Inhibitor von PI3K) bzw. in Kombination mit 40 μ M SB203580 + 10 μ M LY294002 vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5% FCS bzw. 5% Serum von Polytrauma-Patienten inkubiert. Nach 4h (A) bzw. 18h (B) wurden die Mcl-1 mRNA-Level mittels qRT-PCR bestimmt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$) *beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (PMN 5% FCS bzw. PMN 5% Polytrauma-Serum); n=3

5.4 Der Einfluss der p38-bzw. PI3K-Inhibition auf die STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma

Die Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass PMN von Polytrauma-Patienten eine Resistenz gegenüber der Apoptose-induzierenden Substanz Staurosporin (STS) aufweisen, die unter anderem mit einer verminderten spontanen Apoptoserate und einer erhöhten Mcl-1 Expression einhergehen (128). Um weiterhin zu klären, ob und über welche Wege die Kinasen p38 und PI3K an der STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma beteiligt sind, wurden PMN aus gesunden Probanden isoliert, in RPMI + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% FCS resuspendiert und je 1 ml mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^6$ in 24-Well-Platten ausgesät. Die Inhibition der p38 MAPK erfolgte mit dem Kinase-Inhibitor SB203580 (40 μ M). Die Inhibition von PI3K erfolgte mit dem Kinase-Inhibitor LY294002 (25 μ M). Weitere Zellen wurden mit beiden Inhibitoren in einer Konzentration von 40 μ M SB203580 + 10 μ M LY294002 simultan behandelt. Nach 20-minütiger Inkubation der PMN mit den Kinase-Inhibitoren wurde 5% Polytrauma-Serum zu den Proben hinzugegeben. Nach 1h Vorinkubation wurden die Zellen mit 0,2 μ M STS behandelt. Wie in Abbildung 12 zu sehen, führt STS, wie bereits aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe bekannt, zu einer verminderten Apoptoserate in mit Polytrauma-Serum behandelten PMN (Abb. 12). Nach Hinzugabe der Kinase-Inhibitoren konnte sowohl in An- als auch in Abwesenheit von STS jeweils eine signifikante Zunahme der Apoptose jeweils im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle festgestellt werden (Abb. 12). Dieser Effekt lässt sich am deutlichsten durch Inhibition mit dem Kinase-Inhibitor LY294002 sowie nach Behandlung mit beiden Inhibitoren simultan feststellen. Die Apoptoseraten der mit STS-behandelten Proben blieben jedoch stets unter den Apoptoseraten der unbehandelten Zellen, die STS-Resistenz konnte durch Inhibition der Kinasen nicht vollständig aufgehoben werden,

aber durch die Inhibition der Kinasen konnte dem antiapoptotischen Effekt von STS auf PMN entgegengewirkt werden (Abb. 12).

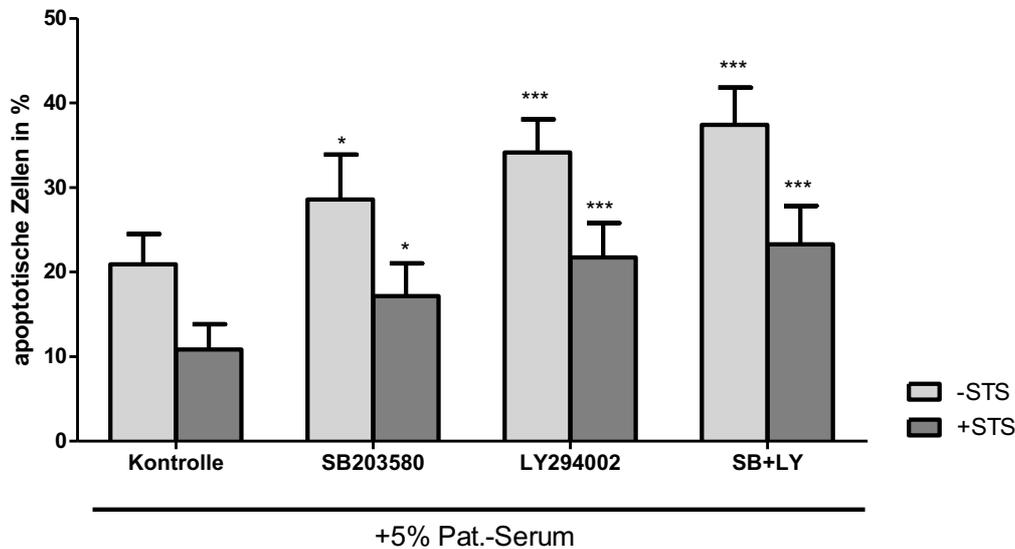


Abbildung 12 | Die Effekte der Kinasen-Inhibition auf die spontane Apoptoserate von PMN nach Behandlung mit Polytrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS gemessen mittels FACS. PMN gesunder Probanden wurden isoliert und in RPMI + 1% P/S+1% FCS aufgenommen und für 20 min jeweils mit 40µM SB203580, 25µM LY294002 sowie in Kombination mit 40 µM SB203580 + 10 µM LY294002 voinkubiert. Zu jedem Well wurde 5% Serum von Polytrauma-Patienten hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Proben wurde anschließend mit 0,2 µM STS behandelt. Nach 18h Inkubation wurde die Apoptose mit PI durchflusszytometrisch bestimmt. Es ist jeweils der prozentuale Anteil der Zellen mit einem sub-G1 Peak dargestellt (entspricht fragmentierter DNA), *beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (PMN mit STS bzw. PMN ohne STS) (*p<0,05; **p<0,005 ***p<0,001); n=15

Um zu untersuchen, ob die Kinasen p38 und PI3K die STS-Resistenz über die Einflussnahme auf das Mitochondrium regulieren, wurde das MMP mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 nach Inhibition der Kinasen nach 4h bestimmt. Die Zellen wurden, wie in den bereits beschriebenen Versuchen isoliert, mit den Kinase-Inhibitoren (40 µM SB203580, 25 µM LY294002 bzw. 40 µM SB203580 + 10 µM LY294002) inkubiert und mit 0,2 µM STS behandelt. Nach 4h wurden die Zellen gesammelt, mit 3µM des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 für 1h bei 37C° inkubiert und durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.13). Es zeigten sich niedrige MMPs in den beiden Kontrollgruppen (mit STS bzw. ohne STS). Nach Inhibition der SB203580 kam es sowohl in An- als auch in Abwesenheit von STS zu einer signifikanten Zunahme des MMPs. Nach der simultanen Inhibition mit SB203580 und LY294002 konnte eine deutlich signifikante Zunahme des MMP in An- und Abwesenheit von STS festgestellt werden. Die PMN, die nur mit LY294002 behandelt wurden, zeigten keine signifikante Zunahme des MMPs nach 4h.

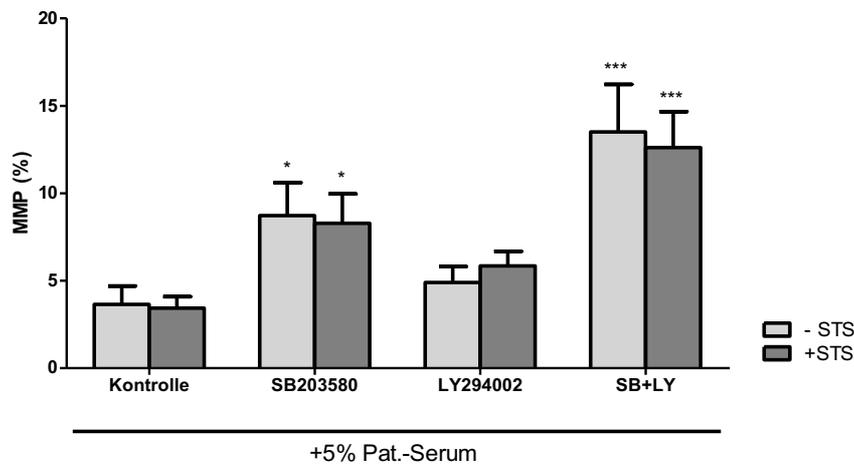


Abbildung 13 | Die Effekte der Kinase-Inhibition auf das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) von PMN nach Behandlung mit Polytrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS. PMN gesunder Probanden wurden isoliert, in RPMI + 1% P/S+1% FCS aufgenommen und für 20 min jeweils mit 40 μ M SB203580, 25 μ M sowie in Kombination mit 40 μ M SB203580 + 10 μ M LY294002 vorinkubiert. Zu den Zellen wurde 5% Serum von Polytrauma-Patienten hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Proben wurde anschließend mit je 0,2 μ M STS behandelt. Nach 4h wurde das MMP mittels JC-1-Fluoreszenzfarbstoff bestimmt (3 μ M JC-1/Probe). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zunahme des grün-fluoreszierenden Farbstoffes von JC-1 als Indiz für die Depolarisation der Mitochondrien. *beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle (PMN mit STS bzw. PMN ohne STS) (* p <0,05; *** p <0,001); n=12

Es sollte weiter untersucht werden, ob die Kinasen an der STS-vermittelten Stabilisierung des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 in mit Patienten-Serum inkubierten PMN beteiligt sind. Die Expression des Mcl-1 Proteins wurde jeweils nach 4h und 18h untersucht (Abb. 14A bzw. 14B). In den beiden Kontroll-PMN (PMN mit bzw. ohne STS) im Vergleich konnten keine unterschiedlichen Mcl-1 Protein-Level nach 4h festgestellt werden. Durch die Inhibition der p38 und der PI3K allein kam es zu einer leichten aber keiner signifikanten Zunahme der Mcl-1 Proteinexpression sowohl in An- als auch in Abwesenheit von STS. Lediglich die PMN, die mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, zeigten in der mit Polytrauma-Serum behandelten Zellen eine höhere Proteinexpression, jedoch ohne Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten. Nach 18h wurden keine signifikanten Unterschiede in der Mcl-1 Proteinexpression in beiden Kontrollgruppen ersichtlich. Auch in den Proben, die mit Kinase-Inhibitoren behandelt wurden, gab es keine relevanten Unterschiede bezüglich der Proteinexpression von Mcl-1 sowohl in der Gruppe mit STS als auch in der Gruppe ohne STS jeweils im Vergleich zur Kontrolle.

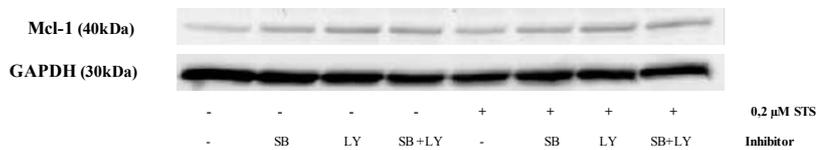
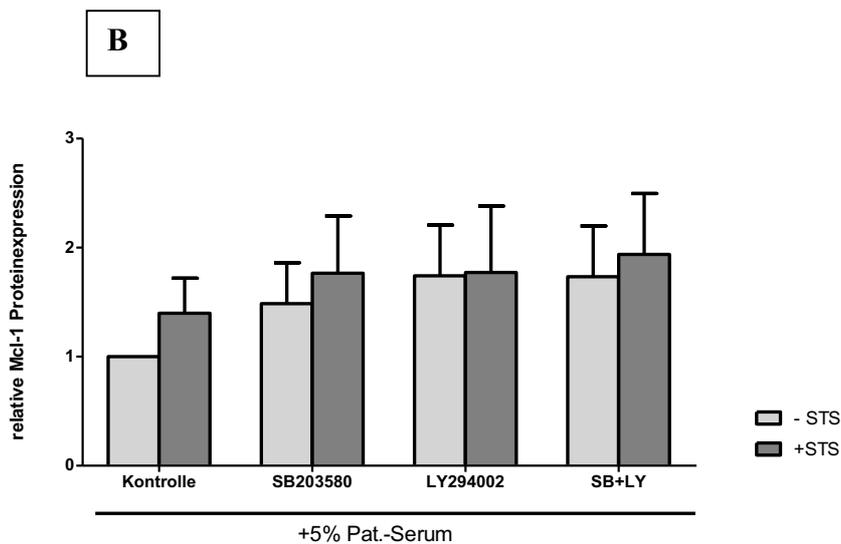
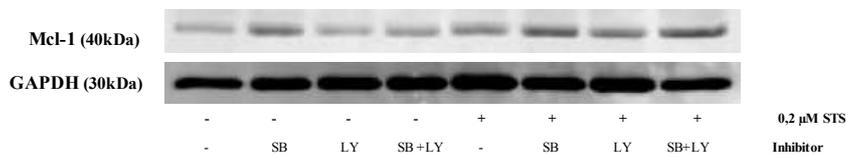
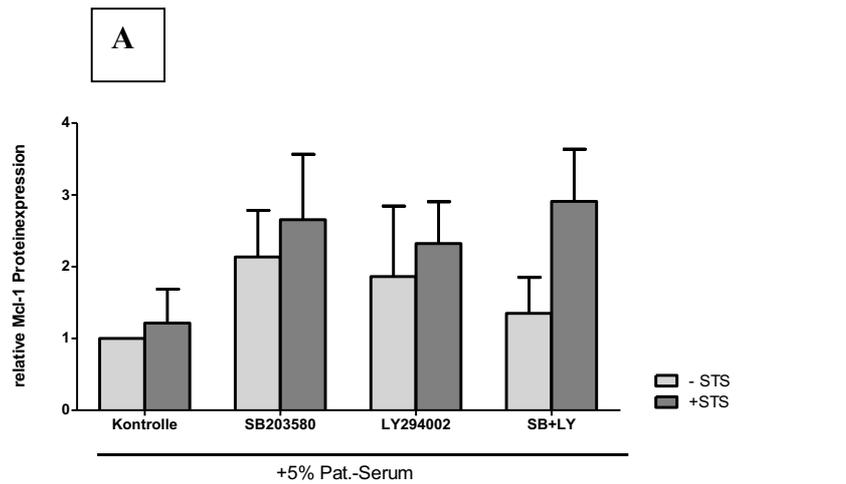


Abbildung 14 | Die Effekte der Kinase-Inhibition auf Mcl-1 Proteinexpression von PMN nach Behandlung mit Polytrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS. PMN gesunder Probanden wurden isoliert, in RPMI + 1% P/S+1% FCS aufgenommen und für 20 min jeweils mit 40 µM SB203580, 25 µM sowie in Kombination mit 40 µM SB203580 + 10 µM LY294002 vorinkubiert. Zu jedem Well wurde 5% Serum von Polytrauma-Patienten hinzugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Proben wurde anschließend mit je 0,2 µM STS behandelt. Nach 4h (A) bzw. 18h (B) wurde die Mcl-1 Proteinexpression analysiert. Als Referenz-Gen diente GAPDH. Die Ergebnisse sind als n-faches der Kontrolle dargestellt. Zusätzlich wurde jeweils beispielhaft eine repräsentative Western blot-Aufnahme abgebildet; n= 6 (A), n=9 (B)

5.5 Der Effekt der GSK-3-Inhibition auf das Apoptoseverhalten der PMN

Es sollte weiter untersucht werden, welchen Einfluss die GSK-3 auf das Apoptoseverhalten und auf die Mcl-1 mRNA-Level bzw. auf die Mcl-1 Proteinexpression von PMN hat.

Für die Versuche wurden PMN gesunder Probanden aus Vollblut isoliert und je 1ml in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ in 24-Well-Platten pipettiert. Da neben der Apoptoserate und der Expression von Mcl-1 mRNA auch die Mcl-1 Protein-Expression untersucht werden sollte, wurden die Zellen mit Cycloheximid vorbehandelt, um die weitere Proteinbiosynthese zu unterbinden. Anschließend wurden die Proben mit $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $0,75 \mu\text{M}$ des GSK-3-Inhibitors CHIR 98014 versetzt.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, führte die Inhibition von GSK-3 mittels CHIR 98014 zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme der PMN Apoptoserate.

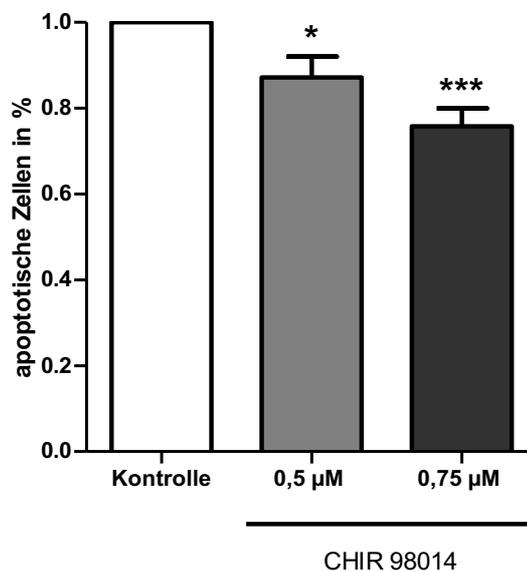


Abbildung 15 | Der Effekt des GSK-3 Inhibitors auf die Apoptoserate von PMN. PMN gesunder Probanden wurden isoliert und in RPMI + 1% P/S+5% FCS aufgenommen. Um die weitere Translation zu hemmen wurden die Proben jeweils mit 9,8 mM Cycloheximid behandelt. Die Proben wurden anschließend mit $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $0,75 \mu\text{M}$ des GSK-3 Inhibitors CHIR 98014 versetzt. Nach 18 h Inkubationszeit wurde die Apoptoserate mit PI durchflusszytometrisch bestimmt. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) $n=20$

Um zu prüfen, ob die Abnahme der Apoptoserate nach GSK-3 Inhibition auf eine erhöhte Expression von Mcl-1 zurückzuführen ist, wurde die Gen- und Proteinexpression von Mcl-1 untersucht.

Abbildung 16 zeigt die Expression von Mcl-1 mRNA der PMN nach der Inhibition der GSK-3 mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CHIR 98014. Es konnte keine deutliche Änderung der Mcl-1 mRNA-Level nach Inhibition mit den unterschiedlichen Konzentrationen nach 4 h (Abb. 16A) festgestellt werden. Nach 18 h (Abb. 16B) scheint die Inhibition der GSK-3 zu einer vermehrten Mcl-1 mRNA Expression zu führen, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede gesehen werden.

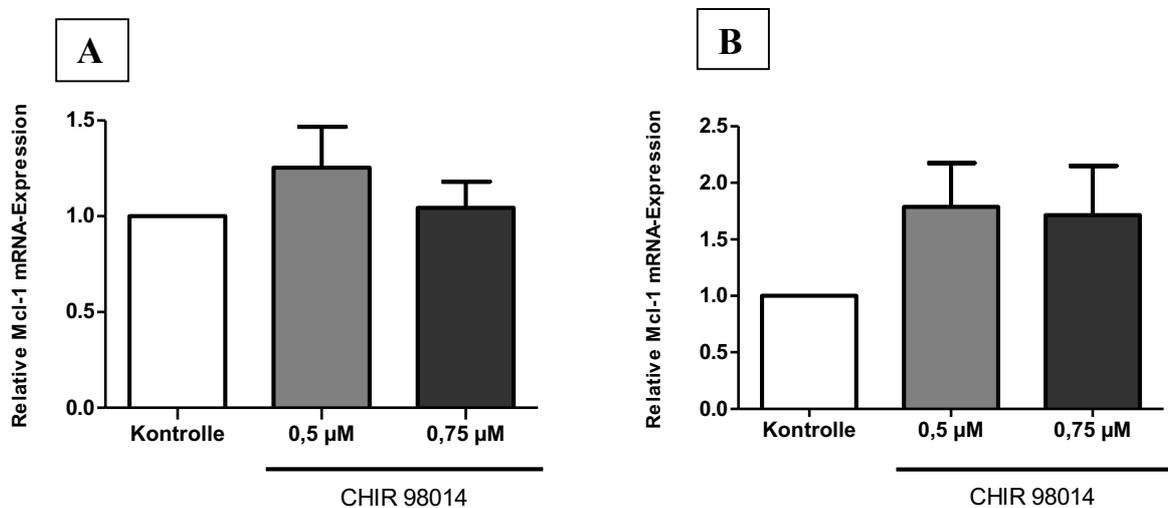


Abbildung 16 | Die Expression von Mcl-1 mRNA in PMN nach Inhibition der GSK-3 in PMN. PMN gesunder Probanden wurden isoliert und in RPMI + 1% P/S + 5% FCS aufgenommen. Um die weitere Translation zu hemmen wurden die Proben jeweils mit 9,8 mM Cycloheximid behandelt. Die Proben wurden anschließend mit 0,5 µM bzw. 0,75 µM des GSK-3 Inhibitors CHIR 98014 versetzt. Nach 4h (A) bzw. 18h (B) Inkubationszeit wurde die Mcl-1 Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind als n-faches der Kontrolle dargestellt; n=9

Um zu untersuchen, ob die GSK-3 Einfluss auf die Mcl-1 Stabilität auf Proteinebene nimmt, wurden die Proben nach 4h bzw. 18h nach Inkubation mit 0,5 µM bzw. mit 0,75 µM CHIR 98014 gesammelt und auf die Mcl-1 Protein-Expression untersucht. Nach 4h zeigt die Inhibition nahezu keine Änderungen in der Mcl-1-Protein-Expression im Vergleich zu den Kontroll-PMN (Abb. 17A). Nach 18h führt die Inhibition jeweils zu einer signifikanten Zunahme der Mcl-1 Proteinkonzentration passend zu der oben gezeigten Abnahme der spontanen Apoptose (Abb. 17B bzw. 17C).

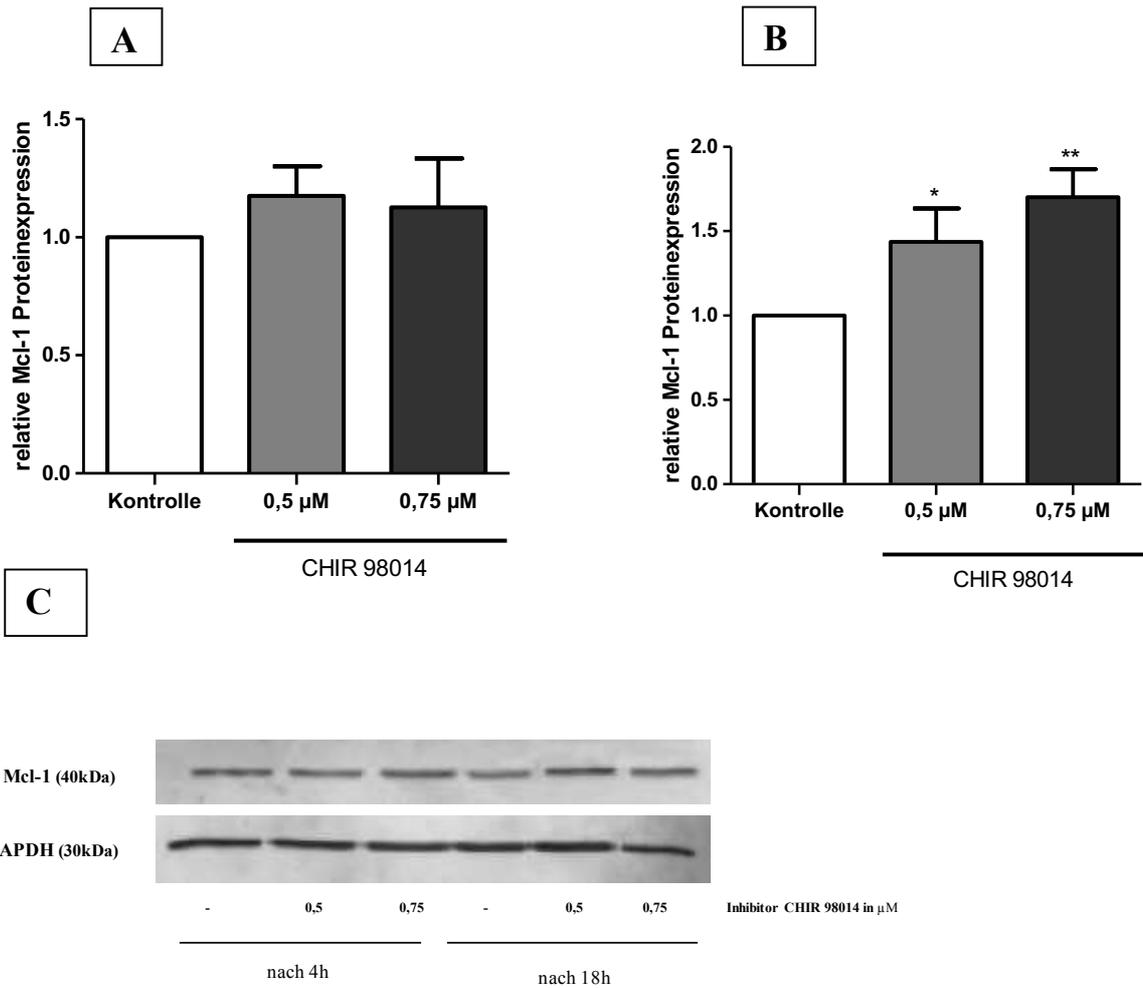


Abbildung 17 | Die Mcl-1 Proteinexpression nach Inhibition der GSK-3 in PMN. PMN gesunder Probanden wurden isoliert und in RPMI + 1% P/S+5% FCS aufgenommen. Um die weitere Translation zu hemmen wurden die Proben jeweils mit 9,8 mM Cycloheximid behandelt. Die Proben wurden anschließend mit 0,5 μ M bzw. 0,75 μ M des GSK-3 Inhibitors CHIR-98014 versetzt. Nach 4h (A) bzw. 18h (B) wurde die Mcl-1 Proteinexpression analysiert. Als Referenzgen diente GAPDH. Die Ergebnisse sind als n-faches der Kontrolle dargestellt. Zusätzlich ist eine repräsentative Western Blot-Aufnahme abgebildet (C). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); $n = 9$

6 Diskussion

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) nehmen eine bedeutende Funktion im Immunsystem ein. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie an der *first line defense* gegen Pathogene beteiligt (148). Interessanterweise entfalten PMN ihre Funktion auch während sterilen Inflammationen, die durch Gewebeverletzung wie auch beim Polytrauma entstehen (31). Um den Körper während eines Polytraumas vor einer überschießenden Immunantwort zu schützen, ist ein Gleichgewicht zwischen Zelluntergang und Zellüberleben der PMN von besonderer Bedeutung. Die PMN von Polytrauma-Patienten weisen ein verlängertes Überleben auf, was gleichzeitig zu einer Dysregulation des Immunsystems mit überschießender Immunantwort führen kann (88,125,130,149). Ein nicht kontrolliertes Immunsystem einhergehend mit einer verstärkten proinflammatorischen Antwort kann zu einem *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) und/oder einem *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) beitragen und als Folge zu einem Multiorganversagen (MOV) führen (150). An der verlängerten Lebensdauer der PMN sind bestimmte Mediatoren (wie z. Bsp. GM-CSF, G-CSF, IL-1 β , sowie TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-15 und INF-gamma, VEGF, Stammzellfaktoren) beteiligt (126,127,129,151–154), die zum Teil auch in erhöhten Konzentrationen im Serum von schwerverletzten Patienten nachgewiesen werden konnten (127,155–157). Es wurde in Vorarbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass diese Faktoren im Serum von Polytrauma-Patienten auch das Apoptoseverhalten von PMN gesunder Probanden beeinflussen (88,153). In den beschriebenen Versuchen führte die Inkubation PMN gesunder Probanden mit Serum-Pools von Patienten, die ein Polytrauma erlitten haben, zu einer verzögerten spontanen Apoptose, zu einer Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und einer damit einhergehenden Stabilisierung von Mcl-1. Die Zellen zeigten zudem eine Resistenz gegenüber der Apoptose-induzierenden Substanz Staurosporin (STS) (88,153). Zu den an der Apoptose-beteiligten Siganlkaskaden gehört neben anderen auch der p38 MAPK Signalweg sowie die PI3K/Akt-Signalkaskade (158,159). Die genauen intrazellulären Mechanismen sind komplex, eine weitere Aufklärung der Apoptoseresistenz in PMN war Ziel dieser Arbeit.

Aufklärung des Apoptoseverhaltens von PMN nach Polytrauma und die Bedeutung der Kinasen p38 und PI3K

Der p38 MAPK Signalweg und der Einfluss auf das Zellüberleben ist komplex und weiterhin nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass die p38 die Apoptose durch die Phosphorylierung proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie induziert (86), andere Studienergebnisse wiederum zeigen, dass die p38 beispielsweise über eine Phosphorylierung von Caspasen antiapoptotischen Einfluss auf die Zellen nimmt (85). Für die abweichenden Funktionsmuster der p38 gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Die p38 lassen sich in vier Isoformen (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) einteilen (74,160–163). Die Isoformen der p38 werden unterschiedlich stark in den verschiedenen Zellen exprimiert, weisen somit eine gewisse Gewebespezifität auf. So konnte in PMN p38 α und p38 δ (76,77), in Drüsengewebe p38 δ und in Skelettmuskel p38 γ identifiziert werden (164). Jede der Isoformen wird zum einen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert, zum anderen weist jede Isoform auch eine unterschiedliche Substratspezifität auf. Die p38 α ist die am besten untersuchte Isoform und ihr werden abhängig vom Gewebe, in dem sie exprimiert wird, unterschiedliche Funktionen zugeordnet (165). Die p38 α in PMN scheint an der Biosynthese der Zytokine IL-1, IL-6 (70) und TNF-alpha (166) beteiligt zu sein. Diese Zytokine sind bekannt für ihre proinflammatorische Funktionen und bekanntlich stehen auch diese Zytokine mit einer verzögerten Apoptose in Verbindung, was die antiapoptotische Funktion der p38 in PMN nach Polytraum untermauert (127,167). Eine Untersuchung der p38 hinsichtlich des Apoptoseverhaltens in mit Serum-behandelten PMN weisen darauf hin, dass die p38 an den antiapoptotischen Funktionen beteiligt ist. Die Inhibition der p38 Kinasen konnte gemessen an der spontanen Apoptose dem Serum-vermittelten antiapoptotischen Effekt entgegenwirken. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe an HL-60 Zellen, einer humanen myeloiden Leukämie-Zelllinie (168).

Mehr Klarheit scheint es hinsichtlich der PI3K und bezüglich ihres Apoptoseverhaltens zu geben. Dass die PI3K antiapoptotischen Einfluss auf Zellen nimmt, konnte erstmals 1995 von zwei Forschergruppen an PC-12 Zellen und IL-3-dependent MC/9 Zellen gesehen werden (169,170). Durch eine gezielte Inhibition der PI3K durch den spezifischen Kinaseinhibitor LY294002 in unseren Versuchen, konnte auch in PMN eine Zunahme der Apoptose gesehen werden, so dass die PI3K auch in mit Polytraumastimulierten PMN eine antiapoptotische Funktion übernimmt. Ein bekannter Weg der

Vermittlung erfolgt über die Akt, welche z.B. über Stabilisierung des antiapoptotischen Proteinen Mcl-1 zu einer verlängerten Überleben der Zellen führt (171). Somit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit zunächst darauf hin, dass sowohl die p38 als auch die PI3K antiapoptotische Funktionen in PMN nach Polytrauma übernehmen.

Insgesamt fällt bei den Ergebnissen bezüglich der prozentualen Apoptoserate jedoch auch auf, dass die Inhibition der PI3K durch LY294002 der Serum-vermittelten Apoptoseresistenz stärker entgegenwirkt, als die Inhibition der p38 durch SB203580. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür könnte der strukturelle Unterschied der Aminosäuresequenz der jeweiligen Isoformen der p38 darstellen, weshalb der Einfluss weniger stark ausgeprägt ist. Es ist bekannt, dass alle Isoformen der p38 mit ihren Aminosäuresequenzen zu einem gewissen Prozentsatz übereinstimmen, wobei die p38 α und p38 β zu 75% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen, die p38 γ und p38 δ zueinander eine 70% Übereinstimmung aufweisen, jedoch mit der α -Isoform nur 62% bzw. 61% identisch sind (172,173). Es ist bekannt, dass der Inhibitor SB203580 nur die Isoformen p38 α und p38 β inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität von p38 γ und p38 δ nimmt (174). Thr¹⁰⁶, eine Aminosäure in der ATP-bindenden Tasche von p38 α und p38 β interagiert mit einem Fluor-Atom von SB203580, was dem Inhibitor ermöglicht, mit Histamin¹⁰⁷ und Leucin¹⁰⁸ zu interagieren und als Folge die Bindung von ATP verhindert. p38 γ und p38 δ exprimieren an dieser Stelle ein Methionin, welches eine längere Seitenkette besitzt und die Bindung des Inhibitors dadurch verhindert (175). Diese partielle Inhibition von nur zwei der vier Isoformen sowie das Wissen, dass in PMN nur die Isoformen p38 α und p38 δ exprimiert werden, wäre eine mögliche Erklärung für die stärkere Aufhebung der Apoptose durch die PI3K. Demgegenüber konnte weiter durch die Versuche dieser Arbeit mit Messungen des MMP gesehen werden, dass durch Inhibition der p38 eine Zunahme der späten Apoptose induziert werden kann, nicht jedoch durch die PI3K Inhibition. Dies deutet auf eine primär nicht über Mitochondrien vermittelte antiapoptotische Regulation der PI3K hin. Bekanntermaßen reguliert die PI3K unter anderem über Regulation der Akt die Expression von Mcl-1 und somit das Apoptoseverhalten (176), so dass im Rahmen dieser Arbeit auch die Funktion von Mcl-1 in PMN weiter untersucht wurde und im Folgenden diskutiert wird.

Das antiapoptotische Protein Mcl-1 als zentrales Protein in PMN nach Polytrauma und die Regulation durch Kinasen

Neben den proapoptotischen Bcl-2 Mitgliedern Bax, Bad und Bok ist auch das Bcl-2 Mitglied Mcl-1 am Zellüberleben beteiligt (66). Ein hoher Anteil an Mcl-1-Protein korreliert mit einem verlängerten Überleben der PMN, geringere Konzentrationen mit einer erhöhten Apoptoserate (177). So zeigte Opferman et al. in einem Mäusemodell, dass eine Deletion von Mcl-1 in frühen Differenzierungsstadien von Lymphozyten zu einer Zunahme der Apoptose führt (178). Ähnliche Ergebnisse konnten im Rahmen von Voruntersuchungen in unserer Arbeitsgruppe in HL-60 Zellen gesehen werden, in denen hohe Mcl-1 Proteinlevel mit einer verzögerten Apoptose korrelierten (168). Die vermehrte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren sowie proinflammatorischer Zytokine, wie auch bei einem Polytrauma, führt zu einer Änderung der Stabilität des Proteins Mcl-1 (88,179). Es konnten bereits unterschiedliche auf Mcl-1 Einfluss-nehmende Serum-Faktoren identifiziert werden, u.a. GM-CSF und IL-1 (120,126). In einer weiteren Versuchsreihe aus unserer Arbeitsgruppe konnte das Akut-Phase-Protein alpha-1-Antitrypsin als einer der Vermittler der antiapoptotischen Wirkung in PMN nach Polytrauma identifiziert werden (147).

Es ist von Interesse, ob die antiapoptotische Funktion der Kinasen in PMN nach Polytrauma über Mcl-1 vermittelt wird und ob eine gezielte Inhibition möglich ist. Zunächst ist bekannt, dass die Regulation der Expression von Mcl-1 auf verschiedenen Ebenen erfolgen kann. In der Literatur werden sowohl transkriptionsabhängige, translationsabhängige als auch posttranslationale Regulationsmechanismen der Apoptose beschrieben (113,180). Eine Untersuchung der Genexpression von Mcl-1 im Rahmen der durchgeführten Versuche deutet darauf hin, dass der Einfluss auf die Apoptose in PMN durch die p38 auch über die Mcl-1 Genexpression vermittelt wird, was die Ergebnisse der Genexpression der PMN +/- Serum nach 18 h zeigen. Nach einer Inkubationszeit von 18h nach Inhibition konnte passend zu der Zunahme der Apoptoserate eine verminderte Mcl-1 mRNA Expression gesehen werden. Der stabilisierende Effekt scheint erst nach einer Inkubationszeit von 18h einzutreten. Nach 4 h konnte nach Inhibition der jeweiligen Serum-behandelten und Serum-unbehandelten Zellen sogar eine Zunahme der Mcl-1 mRNA-Expression gesehen werden. In der frühen Phase scheint der durch p38 Inhibition induzierte apoptotische Effekt, wie es in der Messung der spontanen Apoptose gemessen werden konnte, demnach über andere

Mechanismen reguliert zu werden. Passend zu diesen Ergebnissen konnten andere Arbeitsgruppen in Tumorzellen u.a. die Zytokine IL-3 und GM-CSF als Mcl-1 transkriptionsinduzierende Mediatoren identifizieren (113). Wang et al. zeigte in einer pro-B-Zelllinie, dass eine IL-3 induzierte Aktivierung des p38 Signalweges über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors PU.1 zu einer Aktivierung der Mcl-1 Transkription führt (181). Ähnliche Wege über die Transkription antiapoptotischer Proteine wären also auch für PMN denkbar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in PMN zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren NfκB und CREB an einer vermehrten Transkription von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt sind (182), eine Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktoren und deren Funktion in PMN nach Polytrauma könnte im Rahmen zukünftiger Arbeiten zu einer weiteren Aufklärung beitragen.

Weiter konnte in den Versuchen zwar ein leichter, jedoch nicht signifikanter Einfluss der PI3K-Inhibition auf die Mcl-1 Genexpression in Serum-behandelten PMN sowie in unbehandelten PMN gesehen werden. Ergebnisse anderer Forschungsgruppen weisen auf eine Regulation von Mcl-1 mRNA über die PI3K hin. Zum Beispiel zeigte eine Forschergruppe in einer pro-B-Zellen, dass die Aktivierung der PI3K-Signalkaskade von IL-3 zu einer Hochregulation von Mcl-1 mRNA führt. Hier konnte ebenfalls der CREB-2 bindende Komplex als Transkriptionsfaktor identifiziert werden (181). Auch der Einfluss von PI3K auf STAT3 konnte bereits gezeigt werden (183), so dass eine Regulation von Transkriptionsfaktoren über die Kinasen auch in PMN denkbar wäre. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Apoptose in PMN nach Polytrauma zwar über Genexpression durch die p38 und weniger stark durch die PI3K beeinflusst wird. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den unbehandelten PMN gegenüber den mit Polytrauma-behandelten Zellen gesehen werden.

Insgesamt muss bei der Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich Effekt und der teilweise nur geringen Unterschiede zwischen mit und ohne Polytraumaserum behandelten PMN bezüglich Apoptose und/oder die Mcl-1 Genexpression bedacht werden, dass es sich bei PMN um eine sehr vulnerable, *sensible* Zellreihe handelt. Als Zellen der frühen Immunantwort sind sie ständig in Bereitschaft und müssen umgehend auf Stimuli reagieren. Durch das Priming werden sie in erhöhte Bereitschaft versetzt, schnell auf Pathogene und andere äußere Einflussfaktoren zu reagieren (20). Eine Isolation der Zellen aus gesunden Probanden birgt potenziell die Gefahr, dass während des Isolationsprozesses ein Priming bzw. eine Aktivierung induziert wird und somit

zum Beispiel die Ausschüttung der Granula mit unter anderem proinflammatorischen Zytokinen induziert wird (40). Daher ist denkbar, dass der Unterschied zwischen mit und ohne Serum behandelten PMN falsch niedrig ausfällt.

Weiter ist bekannt, dass Mcl-1 Spaltprodukte als proapoptotische Proteine fungieren können (116). Hier wäre auch eine Regulation über Spaltprodukte denkbar. In Mcl-1/- Knockout Mäusen konnte in Versuchen durch GM-CSF dem Effekt der erhöhten Apoptose teilweise entgegengewirkt werden, so dass vermutet wird, dass antiapoptotische Proteine wie A1 an Stelle von Mcl-1 rekrutiert werden können, die dann bei Abwesenheit von Mcl-1 antiapoptotische Funktionen übernehmen (184).

Neben einer transkriptionsabhängigen Regulation der Mcl-1 Expression sind auch posttranslationsabhängige Regulationen von Mcl-1 beschrieben. In einer Vorarbeit konnte eine Proteasom als auch Caspasen-abhängige Beteiligung an der Apoptoseresistenz gezeigt werden- eine Polyubiquitinierung von Proteinen führt zu einem Abbau von diesen in Proteasomen (168). Auch Nijhawan et al. zeigte dass UV-Bestrahlung von HeLa-Zellen zu einem Abbau von Mcl-1 über das Proteasom führt (185). Im Verlauf konnte die E3 ubiquitin-ligase (MULE) als ein für die Polyubiquitinierung verantwortliches Enzym identifiziert werden (186). Eine weiterführende Untersuchung der Rolle der Kinasen und der posttranslationsabhängigen Regulation ist ein möglicher Ansatz weiterer Untersuchungen.

Die GSK-3 übernimmt apoptotische Funktion in PMN

Initial wurde die GSK-3 als Protein identifiziert, welches an der Regulation der Glykogen-Synthese beteiligt ist (187). Weiterhin zeigte sich, dass die GSK-3 eine Vielzahl an Zielsubstraten hat und somit nicht nur Einfluss auf den Metabolismus nimmt, sondern auch auf die Zellstruktur, die Genexpression und die Apoptose (188). Die Funktionen der GSK-3 sind insgesamt komplex, die Regulationsmechanismen nicht vollständig geklärt. Vor allem die Funktion in der Apoptoseregulation wird in der Literatur als „paradox“ beschrieben. Abhängig vom Apoptoseweg (extrinsisch vs. intrinsisch) induziert bzw. inhibiert die GSK-3 die Apoptose. Eine proapoptotische Funktion wird ihr im Rahmen der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges zugesprochen, wohingegen ihr Funktion im extrinsischen Apoptoseweg antiapoptotisch zu sein scheint (189). Auch die unterschiedlichen Isoformen (α und β) zeigen unterschiedliche Funktionen. In PMN wird vor allem die Isoform GSK α exprimiert

(109). Ein bekannter Weg der Regulation der Kinase ist der PI3K-Signalweg (190), weshalb untersucht werden sollte, welche Funktion und die GSK-3 in PMN übernimmt. Es konnte durch die Versuche dieser Arbeit gezeigt werden, dass die GSK-3 in PMN apoptotisch wirkt. Früh konnten Insulin oder Wachstumsfaktoren als Mediatoren identifiziert werden, die zur Phosphorylierung von Akt führen, welche wiederum durch Phosphorylierung der GSK-3 an Serinresten zu deren Inaktivierung führt. Diese Vorgänge bewirken ein verlängertes Zellüberleben (191–193).

Eine mögliche Regulation erfolgt auf Proteinebene über das antiapoptotische Protein Mcl-1. Bei fehlenden Stimuli (wie z.B. Insulin, Wachstumsfaktoren) befindet sich die GSK-3 in aktivem Zustand, was zu einer Phosphorylierung von Mcl-1 und als Folge zu einem Abbau in Proteasomen führt (192–194). Hierzu passend korrelierte in den Versuchen die Expression des Proteins gemessen nach 18 h invers mit der Apoptoserate nach Hemmung der GSK-3. Also kann auch in unstimulierten PMN der GSK-3 apoptotische Funktion über Regulation des Proteins Mcl-1 zugesprochen werden. Die GSK-3 reguliert bekanntlich auch eine Reihe an Transkriptionsfaktoren, wie NfκB oder CREB (194). Auf Genebene konnte nach Inhibition zwar eine Zunahme der Mcl-1 Transkripte gesehen werden, jedoch war diese nicht signifikant. Somit lässt sich annehmen, dass eine Regulation der Transkription prinzipiell möglich ist, posttranskriptionelle Regulationsmechanismen könnten aber vermutlich eine größere Rolle spielen.

Staurosporin-Resistenz in PMN nach Polytrauma, mögliche Regulationsmechanismen

Staurosporin (STS) gehört zur Gruppe von Induktoren der intrinsischen Apoptose. Die genauen Mechanismen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Zunächst konnte STS als Inhibitor der Protein-Kinase C identifiziert werden (195,196). Im Verlauf wurde herausgefunden, dass STS ein nicht-selektiver Inhibitor einer Vielzahl von Kinasen ist (197). Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigten, dass PMN polytraumatisierter Patienten eine STS-Resistenz aufweisen, die mit einer verzögerten Apoptose einhergeht (88,128). Es konnte in den Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Apoptose-Resistenz durch die Inhibition p38 und PI3K entgegengewirkt werden kann, die STS-Resistenz konnte aber nicht vollständig aufgehoben werden. Gleichzeitig ergab sich auch in der Kontrollgruppe eine Zunahme der Apoptose nach Inhibition der Kinasen, so dass aus

diesen Ergebnissen eine Regulation der spontanen Apoptose durch diese Kinasen abgeleitet werden kann. Darüber hinaus konnte gesehen werden, dass der PI3K-Signalweg stärkeren Einfluss auf die spontane Apoptose zu nehmen scheint. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die STS-Resistenz mit einer anhaltenden Aktivität der Akt und einer verminderten Mcl-1 Degradation einhergeht, was den stärkeren Einfluss durch die PI3K bezogen auf die spontane Apoptose letztendlich erklären könnte (168). Scarlett et al. haben zudem gezeigt, dass der Einfluss von STS über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird (198). Die STS-induzierte spontane Apoptose ging in diesen Versuchen passend zu den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe mit einer mitochondrialen Hyperpolarisation, einer vermehrten Freisetzung von Cytochrom c sowie einer vermehrten Caspase-3 Aktivierung einher, die alle Substrate des PI3K/Akt-Signalweges sind (198).

Demgegenüber zeigte sich bei der frühen Apoptose mittels Messung des MMPs eine signifikante Zunahme durch Inhibition des p38 MAPK Signalweges. Durch simultane Inhibition fiel der Effekt noch stärker aus. Interessanterweise konnte der STS-Resistenz durch die alleinige Inhibition der PI3K in der frühen Phase in beiden Zellreihen nicht entgegengewirkt werden.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die partielle Aufhebung der Resistenz könnte das Protein Bcl-2 bieten. Es ist bekannt, dass die Überexpression von Bcl-2 protektiven Einfluss auf die STS-induzierte Apoptose ausübt (199), der Apoptoseinduktion somit entgegenwirkt. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für PMN bleibt jedoch unklar, zumal es unterschiedliche Ergebnisse gibt, ob Bcl-2 Proteine in PMN überhaupt exprimiert werden (200). Weiter konnte STS in chemotherapeutika-resistenten Jurkat-Zellen die Apoptose induzieren, was auf einen Mitochondrien unabhängigen Weg hindeutet (201). Die vollständige Klärung der STS-Resistenz in PMN nach Polytrauma bleibt abschließend unklar. Das Verständnis der STS-Resistenz in Neutrophilen Granulozyten von Patienten nach Polytrauma ist sicherlich auch für weitere Forschungsschwerpunkte interessant. So konnte STS z.B. bereits erfolgreich experimentell in Tumorzellen Apoptose induzierend eingesetzt werden (202).

Limitierende Faktoren/ Einschränkungen

Im Rahmen unserer Studie wurden isolierte PMN aus dem peripheren Blut von freiwilligen Spendern mit Serum-Pools von Patienten nach Polytrauma inkubiert. Es ist bekannt, dass die Funktion von PMN durch viele endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden kann. Wie bereits oben erwähnt, müssen PMN als Teil der frühen Immunantwort unmittelbar auf Reize/Stimuli reagieren. Volk et al. zeigten, dass beispielsweise TNF- α zu einer Priming der PMN führt, durch die diese in einen Zustand der erhöhten Bereitschaft auf weitere Stimuli gebracht werden (20,40). Als Folge kann eine inflammatorische Antwort beispielsweise allein durch eine Isolation der Zellen induziert werden, welches dadurch Einfluss auf das Apoptoseverhalten haben könnte.

Ein weiterer Einflussfaktor, der das Verhalten der PMN beeinflusst, ist das Alter der Spender (203). Die Apoptose von PMN junger Spender wird durch die Substrate GM-CSF, LPS, G-CSF, IL-2, IL-6 herabgesetzt, bei PMN älterer Spender fiel der Effekt deutlich geringer aus (203,204). Offenbar ist also der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf das Apoptoseverhalten der PMN abhängig vom Alter der Spender. In dieser Studie wurden Spender unterschiedlichen Alters verwendet, so dass ein dadurch bedingtes unterschiedliches Apoptoseverhalten nicht auszuschließen ist.

Außerdem haben andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass das Verhalten von PMN durch weitere exogene Faktoren stark beeinflusst werden kann. Vor allem langjähriges Rauchen führt zu vielfältigen Veränderungen. Es konnte u.a. ein Anstieg der weißen Blutzellen im peripheren Blut und phänotypische Veränderungen wie eine Zunahme von L-Selectinen auf der Zelloberfläche von PMN nachgewiesen werden (205). Dieser Mechanismus wird auch mit der Entwicklung chronischer Lungenerkrankungen in Verbindung gebracht (206). Ergänzend zeigen Ergebnisse, dass Nikotin dosis-abhängig zu einem verlängerten Überleben der PMN führen kann (207).

PMN gehören zur *first line defense*, eine schnelle Immunantwort muss gewährleistet sein. Studien zeigen, dass u.a. hypoxische Zustände über die Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 zu einer verzögerten Apoptose der PMN führen (180). Ein weiterer Einfluss auf die Aktivierung der PMN kann durch die venöse Stauung durch die Blutentnahme induziert werden. Eine durch die Stauung erhöhte Stase könnte zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren führen und die Aktivierung der PMN induzieren (208).

Auch die Isolationsverfahren haben potenziell Einfluss auf die Aktivierung und Funktion der PMN. Zahler und seine Kollegen zeigten, dass die in der vorliegenden Studie verwendete Percoll-Isolation keine reine PMN-Population gewährleistet. Es zeigte sich z.B. eine Verunreinigung mit Eosinophilen und ein Einfluss auf das Zellüberleben durch die proinflammatorische Funktion der Eosinophilen ist denkbar (209).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass das Apoptoseverhalten von vielen Faktoren abhängig ist, was bei der Interpretation der Ergebnisse von Versuchen mit PMN stets berücksichtigt werden sollte.

Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Regulation der Apoptose ist ein komplexer Vorgang, an dem eine Vielzahl von Stimuli, Signalkaskaden und Proteinen beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte die Relevanz der p38 und PI3K in PMN nach Polytrauma sowie die Funktion der GSK-3 im Apoptoseverhalten von PMN näher untersucht werden. Eine exakte Regulation der Apoptose stellt eine Herausforderung im Management von Patienten mit Polytrauma dar. Ein Ungleichgewicht von pro- und antiapoptischen Signalen kann das Überleben von Patienten mit Polytrauma wesentlich beeinflussen. Ähnlich Dysregulationen der Apoptose sind aus der Onkologie bekannt. Bestandteil der aktuellen Forschung sind vor allem Inhibitoren der antiapoptischen intrazellulären Proteine. Das Protein Mcl-1 nimmt hier als antiapoptisch wirkendes Protein einen besonderen Stellenwert ein. Eine Überexpression konnte in verschiedenen Tumorarten wie z.B. dem Prostata-Karzinom (210), dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (211) oder dem Hepatozellulärem Karzinom (212) gefunden werden. Anfang 2000 standen *small-molecule* Inhibitoren als therapeutische Option im Fokus der Forschung. Die Forschergruppe um Oltersdorf konnte mit dem Inhibitor ABT 737, der an BCL-2 sowie Bcl-X_L bindet, deren Interaktion mit den proapoptischen Proteine Bax, Bak und Noxa und damit der antiapoptischen Wirkung entgegensteuern. Hier scheint auch das Protein Mcl-1 beteiligt zu sein, welches nur schwach von ABT 737 gebunden wird und demnach zu einer erhöhten Expression von Mcl-1 in Tumorzellen führt. Mcl-1 weist somit eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor auf (213). Des Weiteren haben in den letzten Jahren Inhibitoren der PI3K immens an Bedeutung in der Tumorthherapie gewonnen. So wurde bereits ein PI3K Inhibitor unter anderem als Zweitlinientherapie in Kombination mit Rituximab oder Ofatumumab bei CLL zugelassen (215), weitere mögliche Zulassungen werden an diversen weiteren Tumorarten erforscht (214). In Bezug auf die Therapie der Sepsis fällt auf, dass ein Schwerpunkt auf dem klinischen Management während der Sepsis gelegt wird. Jedoch bieten die aktuellen Erkenntnisse aus der Tumorforschung eventuell in naher Zukunft auch Chancen für die Sepsisforschung und Sepsistherapie. Stets ist das Ziel, die schweren Verläufe nach Polytrauma mit hoher Sterblichkeit der Patienten günstig zu beeinflussen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Krug EG, Sharma GK, Lozano R. The global burden of injuries. *Am J Public Health*. April 2000;90(4):523–6.
2. Haagsma JA, Graetz N, Bolliger I, Naghavi M, Higashi H, Mullany EC, u. a. The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the Global Burden of Disease study 2013. *Inj Prev J Int Soc Child Adolesc Inj Prev*. Februar 2016;22(1):3–18.
3. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma*. Juni 2006;60(6 Suppl):S3-11.
4. G M, H T. [Rescue and first aid for the severely traumatized] [Internet]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*. 1978 [zitiert 9. März 2021]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/361353/>
5. Baker SP, O’Neill B, Haddon W, Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma*. März 1974;14(3):187–96.
6. Civil ID, Schwab CW. The Abbreviated Injury Scale, 1985 revision: a condensed chart for clinical use. *J Trauma*. Januar 1988;28(1):87–90.
7. Pape H-C, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, u. a. The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new „Berlin definition“. *J Trauma Acute Care Surg*. November 2014;77(5):780–6.
8. Aldrian S, Koenig F, Weninger P, Vécsei V, Nau T. Characteristics of polytrauma patients between 1992 and 2002: what is changing? *Injury*. September 2007;38(9):1059–64.
9. Acosta JA, Yang JC, Winchell RJ, Simons RK, Fortlage DA, Hollingsworth-Fridlund P, u. a. Lethal injuries and time to death in a level I trauma center. *J Am Coll Surg*. Mai 1998;186(5):528–33.
10. Baker CC, Oppenheimer L, Stephens B, Lewis FR, Trunkey DD. Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg*. Juli 1980;140(1):144–50.
11. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am*. August 1983;249(2):28–35.

12. Tisherman SA, Forsythe RM, Kellum JA. Trauma Intensive Care. OUP USA; 2013. 350 S.
13. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, u. a. 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. Juni 1992;101(6):1644–55.
14. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. Intensive Care Med. 2000;26 Suppl 1:S64-74.
15. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, u. a. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 23. Februar 2016;315(8):801–10.
16. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. N Engl J Med. 6. Juli 2000;343(1):37–49.
17. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. Injury. Juni 2005;36(6):691–709.
18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 24. Februar 2006;124(4):783–801.
19. Basset C, Holton J, O’Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. Vaccine. 1. Juni 2003;21 Suppl 2:S12-23.
20. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. Int Immunopharmacol. November 2010;10(11):1325–34.
21. Turvey SE, Broide DH. Chapter 2: Innate Immunity. J Allergy Clin Immunol. Februar 2010;125(2 Suppl 2):S24–32.
22. Faist E, Meakins J, Schildberg FW. Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches. Springer Science & Business Media; 2012. 1219 S.
23. Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al. Mai 1998;47(5):201–10.
24. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 19. März 2010;140(6):805–20.
25. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol. Februar 1997;9(1):4–9.

26. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:321–42.
27. McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *J Cell Death*. 8. Mai 2014;7:15–23.
28. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin Chest Med*. Dezember 2008;29(4):617–viii.
29. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. Juli 1996;24(7):1125–8.
30. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. Januar 2009;101(1):36–47.
31. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. Dezember 2007;38(12):1336–45.
32. Parke AL, Liu PT, Parke DV. Multiple organ dysfunction syndrome. *Inflammopharmacology*. 2003;11(1):87–95.
33. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg WJES*. 20. Mai 2006;1:15.
34. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma*. April 1996;40(4):501-510; discussion 510-512.
35. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. März 2004;172(5):2731–8.
36. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. August 2010;31(8):318–24.
37. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. November 2003;5(14):1317–27.
38. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatol Oxf Engl*. September 2010;49(9):1618–31.
39. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci Lond Engl* 1979. Mai 1998;94(5):461–71.
40. Volk APD, Barber BM, Goss KL, Ruff JG, Heise CK, Hook JS, u. a. Priming of Neutrophils and Differentiated PLB-985 Cells by Pathophysiological Concentrations of

- TNF- α Is Partially Oxygen Dependent. *J Innate Immun.* April 2011;3(3):298–314.
41. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium. *Am J Pathol.* Januar 2008;172(1):1–7.
 42. Calabrese EJ. Cell migration/chemotaxis: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol.* Juli 2001;31(4–5):615–24.
 43. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods.* 17. Dezember 1999;232(1–2):3–14.
 44. Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol.* 1. August 1993;151(3):1482–90.
 45. J P, F H, L K, Lp L. The systemic inflammatory response induced by trauma is reflected by multiple phenotypes of blood neutrophils, *Injury.* 2007
 46. Clarke PGH, Clarke S. Nineteenth century research on cell death. *Exp Oncol.* Oktober 2012;34(3):139–45.
 47. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251–306.
 48. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* August 1972;26(4):239–57.
 49. Williams GT, Smith CA, McCarthy NJ, Grimes EA. Apoptosis: Final control point in cell biology. *Trends Cell Biol.* 1. September 1992;2(9):263–7.
 50. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol.* September 1996;271(3 Pt 2):F477-488.
 51. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 10. März 1995;267(5203):1456–62.
 52. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
 53. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Cell Death and Its Regulation. 2000 [zitiert 19. Januar 2017]; Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21716/>
 54. Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev.* August 1994;4(4):581–6.
 55. Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* September 1997;7(9):353–61.

56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 28. August 1998;281(5381):1312–6.
57. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, u. a. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 18. Oktober 1996;87(2):171.
58. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 20. Oktober 2008;27(48):6194–206.
59. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 14. November 1997;91(4):443–6.
60. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, u. a. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 15. November 1995;14(22):5579–88.
61. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 15. Januar 2005;118(2):265–7.
62. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, u. a. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1. September 1996;184(3):1155–60.
63. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, u. a. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 1. April 1996;183(4):1533–44.
64. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1. August 1999;13(15):1899–911.
65. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 30. Juli 2004;305(5684):626–9.
66. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Januar 2008;9(1):47–59.
67. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ*. 24. Oktober 2003;11(2):143–53.
68. Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MRH, Edwards SW. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol*. 11. Januar 2001;70(5):783–92.
69. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil

- apoptosis. *FEBS Lett.* 5. Januar 2001;487(3):318–22.
70. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, u. a. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 22. Dezember 1994;372(6508):739–46.
71. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49–139.
72. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 1. März 2001;410(6824):37–40.
73. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, u. a. MAP kinases. *Chem Rev.* August 2001;101(8):2449–76.
74. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, u. a. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem.* 28. November 1997;272(48):30122–8.
75. Keesler GA, Bray J, Hunt J, Johnson DA, Gleason T, Yao Z, u. a. Purification and Activation of Recombinant p38 Isoforms α , β , γ , and δ . *Protein Expr Purif.* 1. November 1998;14(2):221–8.
76. Hale KK, Trollinger D, Rihaneck M, Manthey CL. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. April 1999;162(7):4246–52.
77. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasch SC, u. a. Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest.* März 1999;103(6):851–8.
78. Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene.* 1. November 1999;18(45):6087–93.
79. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, u. a. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 23. September 1994;78(6):1039–49.
80. Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med.* 1. Februar 1990;171(2):465–75.
81. Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today.* Oktober 1999;5(10):439–47.
82. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated

- by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*. 6. Dezember 2002;298(5600):1911–2.
83. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura J-J, Kelkar N, Tanaka Y, u. a. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 15. August 2003;17(16):1969–78.
84. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, u. a. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science*. 15. Februar 2002;295(5558):1291–4.
85. Alvarado-Kristensson M, Melander F, Leandersson K, Rönstrand L, Wernstedt C, Andersson T. p38-MAPK Signals Survival by Phosphorylation of Caspase-8 and Caspase-3 in Human Neutrophils. *J Exp Med*. 16. Februar 2004;199(4):449–58.
86. Cai B, Chang SH, Becker EBE, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*. 1. September 2006;281(35):25215–22.
87. Sheth K, Friel J, Nolan B, Bankey P. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase increases lipopolysaccharide induced inhibition of apoptosis in neutrophils by activating extracellular signal-regulated kinase. *Surgery*. August 2001;130(2):242–8.
88. Paunel-Görgülü A, Kirichevska T, Lögters T, Windolf J, Flohé S. Molecular Mechanisms Underlying Delayed Apoptosis in Neutrophils from Multiple Trauma Patients with and without Sepsis. *Mol Med*. 7. Dezember 2011;18(1):325–35.
89. Olson JM, Hallahan AR. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med*. März 2004;10(3):125–9.
90. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*. 8. Dezember 2003;22(56):8983–98.
91. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 15. November 1999;13(22):2905–27.
92. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2008;11(1–2):32–50.
93. Brachmann SM, Yballe CM, Innocenti M, Deane JA, Fruman DA, Thomas SM, u. a. Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Mol Cell Biol*. April 2005;25(7):2593–606.
94. Webb PR, Wang KQ, Scheel-Toellner D, Pongracz J, Salmon M, Lord JM. Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. November 2000;5(5):451–8.

95. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* Juli 1997;22(7):267–72.
96. Yuan T, Cantley L. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 18. September 2008;27(41):5497–510.
97. Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B, Carrera AC. The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem.* 1. November 2002;277(44):41556–62.
98. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:615–75.
99. Kurosu H, Maehama T, Okada T, Yamamoto T, Hoshino S, Fukui Y, u. a. Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J Biol Chem.* 26. September 1997;272(39):24252–6.
100. Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt Is a Direct Target of the Phosphatidylinositol 3-Kinase ACTIVATION BY GROWTH FACTORS, v-src and v-Ha-ras, IN Sf9 AND MAMMALIAN CELLS. *J Biol Chem.* 29. November 1996;271(48):30835–9.
101. Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol.* April 2005;17(2):141–9.
102. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, u. a. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol CB.* 1. April 1997;7(4):261–9.
103. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, u. a. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 6. März 2003;17(3):590–603.
104. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, u. a. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science.* 30. Januar 1998;279(5351):710–4.
105. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell

- survival and beyond. *Trends Biochem Sci.* September 1997;22(9):355–8.
106. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature.* 2. September 1999;401(6748):86–90.
107. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* August 1990;9(8):2431–8.
108. Maurer U, Preiss F, Brauns-Schubert P, Schlicher L, Charvet C. GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *J Cell Sci.* 1. April 2014;127(Pt 7):1369–78.
109. Giambelluca MS, Cloutier N, Rollet-Labelle E, Boilard E, Pouliot M. Expression and regulation of glycogen synthase kinase 3 in human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol.* 1. November 2013;45(11):2660–5.
110. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell.* 17. März 2006;21(6):749–60.
111. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. April 1993;90(8):3516–20.
112. Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gómez G, Brady HJM. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 3. März 2006;281(9):5750–9.
113. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* 16. Juli 2010;584(14):2981–9.
114. Townsend KJ, Zhou P, Qian L, Bieszczad CK, Lowrey CH, Yen A, u. a. Regulation of MCL1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem.* 15. Januar 1999;274(3):1801–13.
115. Craig RW. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia.* April 2002;16(4):444–54.
116. Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJW. MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *J Biol Chem.* 18. August 2000;275(33):25255–61.
117. Kobayashi S, Lee S-H, Meng XW, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, u. a. Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J Biol Chem.* 22. Juni 2007;282(25):18407–17.
118. Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, u. a. Phosphorylation

and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 15. November 2002;277(46):43730–4.

119. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 21. Dezember 1995;378(6559):785–9.

120. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem.* 25. Juni 2004;279(26):26915–21.

121. Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, u. a. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood.* 1. November 1997;90(9):3356–63.

122. Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, Winchurch RA. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol.* Juni 1996;59(6):835–9.

123. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, u. a. Neutrophil Apoptosis in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1. Dezember 1997;156(6):1969–77.

124. Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E, u. a. Delayed Neutrophil Apoptosis Induced by Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1. Juni 2002;966(1):226–31.

125. Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, u. a. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NFkappabeta dependent. *J Trauma.* April 2000;48(4):599-604; discussion 604-605.

126. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 15. Oktober 1992;80(8):2012–20.

127. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* August 2000;118(2):503–8.

128. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, u. a. Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. November 2009;183(10):6198–206.

129. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 10. Januar

1993;54(4):283–8.

130. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med.* Juli 2004;32(7):1460–9.

131. T G, T M, M T. Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function *Surgery.* 1994

132. Biffl WL, Moore EE, Zallen G, Johnson JL, Gabriel J, Offner PJ, u. a. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery.* August 1999;126(2):198–202.

133. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 9. Februar 1989;320(6):365–76.

134. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 3. Juni 1991;139(2):271–9.

135. Cossarizza A, Franceschi C, Monti D, Salvioli S, Bellesia E, Rivabene R, u. a. Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Exp Cell Res.* September 1995;220(1):232–40.

136. Petit PX, Lecoer H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol.* Juli 1995;130(1):157–67.

137. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 27. Juni 1970;226(5252):1209–11.

138. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 27. Juni 1970;226(5252):1211–3.

139. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Enzymology B-M* in, Herausgeber. Academic Press; 1987 [S. 335–50. (Recombinant DNA Part F; Bd. 155).

140. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques.* Juni 1998;24(6):954–8, 960, 962.

141. Zhang X, Huang C, Xu S, Chen J, Zeng Y, Wu P, u. a. Photocatalytic oxidation of TMB with the double stranded DNA–SYBR Green I complex for label-free and

- universal colorimetric bioassay. *Chem Commun.* 15. September 2015;51(77):14465–8.
142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* Dezember 2001;25(4):402–8.
143. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* Februar 1949;177(2):751–66.
144. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
145. Steinhardt J, Reynolds JA. *Multiple Equilibria in Proteins.* Academic Press; 2014. 404 S.
146. Chen null, Teixeira null. Structure and fractal dimension of protein-detergent complexes. *Phys Rev Lett.* 17. November 1986;57(20):2583–6.
147. Sarabhai T, Peter C, Bär A-K, Windolf J, Relja B, Wesselborg S, u. a. Serum α -1 Antitrypsin (AAT) antagonizes intrinsic apoptosis induction in neutrophils from patients with systemic inflammatory response syndrome. *PloS One.* 2017;12(5):e0177450.
148. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* Februar 2010;125(2 Suppl 2):S24-32.
149. Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, u. a. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg Chic Ill 1960.* Dezember 1997;132(12):1263-1269; discussion 1269-1270.
150. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, u. a. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* April 2003;29(4):530–8.
151. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood.* 1. Dezember 1992;80(11):2920–4.
152. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J.* 1. Juli 1997;325(Pt 1):147–53.
153. Biffi WL, West KE, Moore EE, Gonzalez RJ, Carnaggio R, Offner PJ, u. a.

Neutrophil apoptosis is delayed by trauma patients' plasma via a mechanism involving proinflammatory phospholipids and protein kinase C. *Surg Infect.* 2001;2(4):289-293; discussion 294-295.

154. Pelletier M, Ratthé C, Girard D. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS Lett.* 4. Dezember 2002;532(1-2):164-70.

155. Tanaka H, Ogura H, Yokota J, Sugimoto H, Yoshioka T, Sugimoto T. Acceleration of superoxide production from leukocytes in trauma patients. *Ann Surg.* August 1991;214(2):187-92.

156. Martin C, Boisson C, Haccoun M, Thomachot L, Mege JL. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. *Crit Care Med.* November 1997;25(11):1813-9.

157. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock Augusta Ga.* August 2001;16(2):83-96.

158. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell.* 8. Dezember 2000;103(6):839-42.

159. Saffar AS, Dragon S, Ezzati P, Shan L, Gounni AS. Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils. *J Allergy Clin Immunol.* Februar 2008;121(2):492-498.e10.

160. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* August 2007;1773(8):1358-75.

161. Mertens S, Craxton M, Goedert M. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1. April 1996;383(3):273-6.

162. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, u. a. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem.* 26. Juli 1996;271(30):17920-6.

163. Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem.* 16. Januar 1998;273(3):1741-8.

164. Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, u. a.

- Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 19. September 1997;272(38):23668–74.
165. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cell Signal.* 1. Januar 2000;12(1):1–13.
166. Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, Horwood NJ, Beech JT, Hayes LA, u. a. A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Dezember 2004;173(11):6928–37.
167. Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol.* Oktober 1994;98(1):71–7.
168. Hornstein T, Lehmann S, Philipp D, Detmer S, Hoffmann M, Peter C, u. a. Staurosporine resistance in inflammatory neutrophils is associated with the inhibition of caspase- and proteasome-mediated Mcl-1 degradation. *J Leukoc Biol.* Januar 2016;99(1):163–74.
169. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science.* 31. März 1995;267(5206):2003–6.
170. Scheid MP, Lauener RW, Duronio V. Role of phosphatidylinositol 3-OH-kinase activity in the inhibition of apoptosis in haemopoietic cells: phosphatidylinositol 3-OH-kinase inhibitors reveal a difference in signalling between interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Biochem J.* 15. November 1995;312(1):159–62.
171. Huang H-M, Huang C-J, Yen JJ-Y. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood.* 1. September 2000;96(5):1764–71.
172. Cuenda A, Cohen P, Buée-Scherrer V, Goedert M. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 15. Januar 1997;16(2):295–305.
173. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* August 2007;1773(8):1358–75.
174. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel

stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* 16. Juni 1997;16(12):3563–71.

175. Eyers PA, Craxton M, Morricel N, Cohen P, Goedert M. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol.* 1. Juni 1998;5(6):321–8.

176. Kuo M-L, Chuang S-E, Lin M-T, Yang S-Y. The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene.* Februar 2001;20(6):677–85.

177. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood.* 1. Oktober 1998;92(7):2495–502.

178. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature.* 11. Dezember 2003;426(6967):671–6.

179. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood.* 1. Oktober 1998;92(7):2495–502.

180. Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery.* 1. August 2000;128(2):171–7.

181. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.* September 1999;19(9):6195–206.

182. Mayer TZ, Simard FA, Cloutier A, Vardhan H, Dubois CM, McDonald PP. The p38-MSK1 Signaling Cascade Influences Cytokine Production through CREB and C/EBP Factors in Human Neutrophils. *J Immunol.* 13. September 2013;1301117.

183. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J.* 1. Dezember 2005;392(Pt 2):335–44.

184. Dzhagalov I, John AS, He Y-W. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood.* 15. Februar 2007;109(4):1620–6.

185. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, et al. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 15. Juni 2003;17(12):1475–86.
186. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Mule/ARF-BP1, a BH3-Only E3 Ubiquitin Ligase, Catalyzes the Polyubiquitination of Mcl-1 and Regulates Apoptosis. *Cell.* 1. Juli 2005;121(7):1085–95.
187. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* Juni 1980;107(2):519–27.
188. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 1. April 2003;116(7):1175–86.
189. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* April 2015;148:114–31.
190. Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul.* 1. August 2017;65:5–15.
191. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J.* 15. September 1993;294 (Pt 3):625–9.
192. Saito Y, Vandenheede JR, Cohen P. The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J.* 1. Oktober 1994;303 (Pt 1):27–31.
193. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. September 1998;95(19):11211–6.
194. Cortés-Vieyra R, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ, Juárez MC, Finlay BB, Baizabal-Aguirre VM. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. *J Inflamm Lond Engl.* 12. Juni 2012;9(1):23.
195. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 13. März 1986;135(2):397–402.
196. Kiyoto I, Yamamoto S, Aizu E, Kato R. Staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor, fails to inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-caused ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells. *Biochem Biophys Res*

Commun. 29. Oktober 1987;148(2):740–6.

197. Rüegg UT, Gillian B. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci.* 1. Juni 1989;10(6):218–20.

198. Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku H-H, Murphy MP. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett.* 23. Juni 2000;475(3):267–72.

199. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 15. April 1994;13(8):1899–910.

200. Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, Gamero AM, Ussery D, Pearson EW, u. a. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1. Dezember 1996;157(11):5155–62.

201. Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, u. a. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene.* 8. März 2001;20(10):1193–202.

202. Malsy M, Bitzinger D, Graf B, Bundscherer A. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. *Eur J Med Res [Internet].* 28. Januar 2019 [zitiert 6. März 2021];24. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348604/>

203. Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard K-P, Lesur O, u. a. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell.* 1. August 2004;3(4):217–26.

204. Fülöp T, Fouquet C, Allaire P, Perrin N, Lacombe G, Stankova J, u. a. Changes in apoptosis of human polymorphonuclear granulocytes with aging. *Mech Ageing Dev.* Juni 1997;96(1–3):15–34.

205. Corre F, Lellouch J, Schwartz D. Smoking and leucocyte-counts. *The Lancet.* 18. September 1971;298(7725):632–4.

206. van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J.* Mai 2000;15(5):915–21.

207. Aoshiba K, Nagai A, Yasui S, Konno K. Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. *J Lab Clin Med.* 1. Februar 1996;127(2):186–94.

208. Kuhnle GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. *Am J Respir Crit Care Med.* Oktober 1995;152(4 Pt 1):1221–8.

209. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods*. 15. Januar 1997;200(1–2):173–9.
210. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, u. a. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*. Mai 1996;148(5):1567–76.
211. Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*. März 2005;4(3):267–76.
212. Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, u. a. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol*. Januar 2006;44(1):151–7.
213. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, u. a. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2. Juni 2005;435(7042):677–81.
214. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer*. 19. Februar 2019;18(1):26.
- 215 <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/idelalisib/idelalisib-neues-anwendungsgebiet-neuer-kombinationspartner-dgho-stellungnahme-20170123.pdf>, zuletzt aufgerufen am 08.03.2021

Online Quellen:

WHO, *Global status report on road safety 2015*, https://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2015/en/
Zuletzt aufgerufen am 08.03.2021

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Zelltod: Apoptose vs. Nekrose

Abbildung 2: Schematische Darstellung der p38-Signalkaskade

Abbildung 3: Schematische Darstellung der PI3K Signalkaskade

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Isolation von PMN aus humanem Vollblut

Abbildung 5: RNA-Extraktion mittels Trizol

Abbildung 6: PCR Amplifikationskurven

Abbildung 7: Bindung von SYBR Green an DNA

Abbildung 8: Versuchsbeschreibung- Inhibition von p38

Abbildung 9: Versuchsbeschreibung- Inhibition von PI3K

Abbildung 10: Die spontane Apoptoserate von PMN nach Inhibition der P38 sowie der PI3K in An- bzw. Abwesenheit von Serum von Polytrauma-Patienten

Abbildung 11: Die Expression von Mcl-1 mRNA in PMN nach Inhibition der p38 sowie der PI3K in An- und Abwesenheit von Serum von Polytrauma-Patienten nach 4h (A) bzw. 18h (B).

Abbildung 12: Die Effekte der Kinasen-Inhibition auf die spontane Apoptoserate von PMN nach Behandlung mit Polatrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS gemessen mittels FACS

Abbildung 13: Die Effekte der Kinase-Inhibition auf das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) von PMN nach Behandlung mit Polytrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS

Abbildung 14: Die Effekte der Kinase-Inhibition auf Mcl-1 Proteinexpression von PMN nach Behandlung mit Polytrauma-Serum in An- und Abwesenheit von STS

Abbildung 15: Der Effekt des GSK-3 Inhibitors auf die Apoptoserate von PMN

Abbildung 16: Die Expression von Mcl-1 mRNA in PMN nach Inhibition der GSK-3 in PMN

Abbildung 17: Die Mcl-1 Proteinexpression nach Inhibition der GSK-3 in PMN

Danksagung

Dr. med. Eva-Beate Rump und Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü

Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dr. med. Christoph Schäfer und Dr. med. Michael Smyk

