

Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Ärztliche Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Henne-Bruns

**Die Auswirkungen des Gewebetraumas auf die
Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit von polymorphkernigen
Leukozyten und ihre Modulation durch die
Protein Kinase D**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

Sven-Thorben Langenberger
geboren in Singen (Hohentwiel), Baden-Württemberg,
Deutschland

2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Henne-Bruns

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hendrik Bracht

Tag der Promotion: 22.11.2019

Ich widme diese Arbeit meiner Familie:

Birgit Langenberger

Gerhard Langenberger

Inken Langenberger

Bjarne Langenberger

Teile dieser Dissertation wurden publiziert in:

Wille C, Eiseler T, Langenberger ST, Richter J, Mizuno K, Radermacher P, Huber-Lang M, Seufferlein T, Paschke S: PKD regulates actin polymerization, neutrophil deformability and transendothelial migration in response to fMLP and trauma. *J Leukoc Biol.* 2018: 615-630
(2018)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	I
II. Abkürzungsverzeichnis.....	II
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	7
2.1 Chemikalien.....	7
2.2 Reagenzien.....	8
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	9
2.4 Geräte.....	9
2.6 Das Tiermodell.....	10
2.6.1 Versuchstiere.....	11
2.6.2 Traumamodell und Versuchsablauf.....	12
2.7 Differenzierung der NB4-Zellen.....	12
2.8 Entnahme der humanen PMN.....	13
2.9 Separation der neutrophilen Granulozyten von Schweinen.....	15
2.10 Separation der humanen neutrophilen Granulozyten.....	16
2.11 Inhibition der PKD.....	17
2.12 Der Optical Stretcher.....	16
2.12.1 Aufbau des Optical Stretcher.....	21
2.12.2 Laser und Messkammer.....	21
2.12.3 Mikrofluidisches System.....	22
2.12.4 Ablauf der Messung im Optical Stretcher.....	24
2.13 Messung der transendothelialen Migrationsfähigkeit.....	25
2.2 Statistik.....	28
3. Ergebnisse.....	29
4. Diskussion.....	42
5. Zusammenfassung.....	50
6. Literaturverzeichnis.....	52
Danksagung.....	58
Lebenslauf.....	59

II. Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ARP 2/3	Actin-related protein 2/3
ATRA	all-trans-Retinsäure
CRT	CRT0066101 (PKD-Inhibitor)
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBM	Familial hypercholesterolemia bretoncelles meishan
FCS	Fetal Calf Serum
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
KB	kb NB 142-70 (PKD-Inhibitor)
NB4	Zelllinie von Promyelozytenleukämie-Zellen
OS	Optical Stretcher
P/S	Penicillin/Streptomycin
PKD	Protein Kinase D
PML	Promyelotic Leucemia Protein
PMN	Polymorphnuclear leucocyte
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAR	Retinsäurerezeptor
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RPMI	Roswell-Park-Institute-Nährmedium
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

Das Gewebetrauma ist eine der häufigsten Todesursachen des Menschen, vor allem in jüngerem Alter. Und noch immer besitzt vor allem das Polytrauma eine hohe Letalität, die viele maligne Erkrankungen hinter sich lässt. Im Jahre 1972 wurde diese mit bis zu 40% angegeben. Seit damals konnten große Fortschritte erzielt werden und die Letalität auf 10-15% gesenkt werden (Sturm 1988). Es ist klar, dass viele Todesfälle gerade bei schweren Polytraumata unvermeidlich sind, denn bis zu 50% der Patienten versterben bereits in der präklinischen Situation (Pfeifer et al. 2009). Doch auch wenn Patienten das initiale Trauma überleben, so bleiben doch oft langfristige Schäden zurück, die zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität dieser Patienten führen. Dies gilt in besonderem Maße für Patienten, die im Rahmen ihres Traumas einen hämorrhagischen Schock erfahren, welcher allein 30-40% aller trauma-induzierten Todesfälle verursacht (Laupland et al. 2010; Manley et al. 2001; Stewart et al. 2003). Doch auch das iatrogene Gewebetrauma, zum Beispiel im Rahmen von invasiven chirurgischen Eingriffen, stellt eine große Belastung für den Patienten dar und muss in der Behandlung berücksichtigt werden. Zusammenfassend kann man deshalb von einem Gewebetrauma sprechen, dass dem Patienten, akzidentell oder iatrogen, zugefügt wird und das gleichartige Reaktionen im menschlichen Körper auslöst und das Outcome beeinflusst.

Durch ein umfassenderes Verständnis der Vorgänge im Organismus in der Phase nach einem Gewebetrauma könnten in Zukunft diese Schäden vermindert oder ganz abgewendet werden. Die Forschung der letzten Jahre zeigt immer mehr, dass ein schweres Gewebetrauma für den Organismus kein regionales Geschehen ist. Vielmehr findet eine Kaskade von Reaktionen auf vielen Ebenen und im ganzen Körper statt, die großen Einfluss auf die physiologischen und biochemischen Vorgänge im Patienten nehmen und somit bei der Behandlung berücksichtigt werden müssen. Als Metapher für diese Vorgänge kann man sich eine Großstadt vorstellen, die von einem Erdbeben heimgesucht wird:

Chaos herrscht am Ort der Katastrophe. Brände breiten sich aus und Menschen sind verschüttet. Auch in der unmittelbaren Umgebung gibt es Schäden an Straßen und Gebäuden. Doch auch Stadtteile, die weit vom Epizentrum entfernt liegen, sind betroffen: Rettungskräfte rücken vor, die öffentliche Infrastruktur ist beschädigt, der Verkehr lahmgelegt. Es kann Wochen oder Monate dauern, bis diese Auswirkungen der Katastrophe beseitigt sind, abhängig davon, wie stabil die Infrastruktur der Stadt zuvor war.

Sehr ähnlich ist die Situation im Organismus, nachdem ein Gewebetrauma stattgefunden hat. Es gibt oft Blutverluste und geschädigtes Gewebe, das seine normale Funktion nicht mehr ausübt. Krankheitserreger können durch Wunden ungehindert eindringen. Der Körper ist gezwungen, an allen Fronten gegenzusteuern. Akute-Phase-Proteine und Katecholamine werden ausgeschüttet. Akut müssen zunächst die Vitalfunktionen gesichert werden. Fibrin und koaguliertes Blut verschließen provisorisch die Wunden, bis später Granulationsgewebe gebildet werden kann. Diese Abläufe müssen auch über Tage und Wochen hinweg gesteuert werden. Dies gelingt durch einen anhaltenden, organismusweiten Alarmzustand, der alle möglichen körperlichen Prozesse betrifft, sowohl makroskopischer als auch mikroskopischer Natur (Xiao et al. 2011).

Die moderne Medizin kann bei vielen dieser Vorgänge Hilfe leisten, in dem zum Beispiel Blutprodukte transfundiert, Blutungen gestillt oder Operationen durchgeführt werden. Es existiert jedoch noch ein weiterer Faktor, der bisher in der Versorgung weitaus weniger Aufmerksamkeit bekommen hat: das Immunsystem. Forschungen haben ergeben, dass das Immunsystem einen großen Einfluss auf das Outcome der Patienten hat. Auch wenn keine nennenswerte Infektion des Organismus besteht, werden Immunzellen, hauptsächlich neutrophile Granulozyten, vom Körper obligatorisch in die trauma-induzierte Reaktion einbezogen. Unter anderem wird durch die lokale Entzündungsreaktion der Abbau von Zelltrümmern beschleunigt und eine Hyperämie ausgelöst, die eine verbesserte Wundheilung und Reparatur der Strukturen erlaubt (Cantürk et al. 2001; Gong u. Koh 2010).

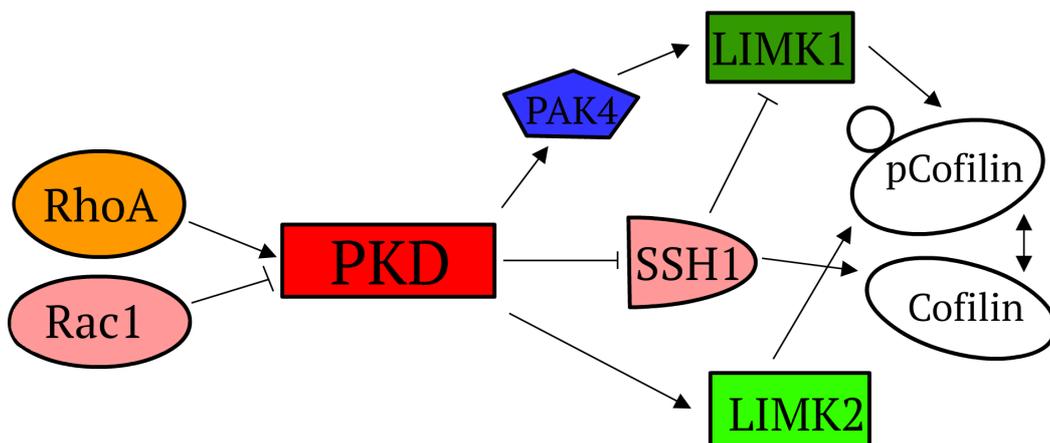
Es gibt jedoch auch Hinweise, dass diese Immunreaktionen zu Organschäden und einem insgesamt schlechteren Outcome führen können. So stehen „überaktivierte“ neutrophile Granulozyten im Verdacht, im Rahmen von Gewebetraumata zu weitergehenden Organschäden zu führen (Carden et al. 1998).

Somit ist das Immunsystem als Zielstruktur zur Behandlung von Patienten, die einem Gewebetrauma ausgesetzt wurden, von großem Interesse. Gerade auf der molekularen und funktionalen Ebene sind viele Mechanismen des Immunsystems jedoch immer noch unverstanden.

Ein wichtiger Indikator für die Fähigkeit des Immunsystems, im Körper aktiv zu werden, ist die Migrationsfähigkeit seiner Immunzellen. Nur wenn diese in der Lage sind, ihr Zytoskelett extrem zu verformen, sowohl aktiv als auch passiv, sind sie in der Lage, die Blutgefäße zu verlassen und zu ihrem Zielort zu gelangen. Die Prozesse, die innerhalb der Zelle für diese Zunahme der Motilität und Rigidität verantwortlich sind, sind bisher nur teilweise bekannt. Ein Fokus der Forschung an der Motilität von Zellen sind seit einigen Jahren die Protein Kinase D (PKD). Dabei handelt es sich um eine Familie von Serin/Threonin-Protein Kinasen, denen wichtige intrazelluläre Signalfunktionen zukommen. Dabei gibt es drei Unterformen, die für Säugetiere relevant sind: PKD 1, PKD 2 und PKD 3.

Aufgrund ihrer funktionellen Synergie mit der Protein Kinase C-Familie (PKC) wurde die PKD ursprünglich der PKC zugerechnet, jedoch später als eigene Familie anerkannt. Dies schlägt sich auch in teils verwirrenden alternativen Benennungen nieder. So wird die PKD 1 alternativ als PKC μ und die PKD 3 als PKC ν bezeichnet (Johannes et al. 1994; Papazyán et al. 2008). Die Unterformen der PKD übernehmen zahlreiche Funktionen, unter anderem im Vesikeltransport des trans-Golgi-Netzwerk und der Regulation von Apoptose, Proliferation und Karzinogenese (Liljedahl et al. 2001; Wille et al. 2014; Yeaman et al. 2004). Hier soll vor allem die Funktion der PKD als Regulator der Cofilin-vermittelten Dynamik des Aktin-Zytoskeletts betrachtet werden.

Dabei ist die PKD in ein komplexes Regulationssystem aus verschiedenen Kinasen und GTPasen eingebunden, die ein engmaschig kontrolliertes Gleichgewicht von phosphorylierten, d.h. inaktivem und dephosphorylierten, d.h. aktivem Cofilin herstellen. Die exakten Zusammenhänge in diesem System sind noch nicht vollständig erforscht, aber einige Schlüsselemente konnten identifiziert werden. Dabei steht die PKD unter der Kontrolle von zwei übergeordneten Proteinen: *Ras homolog gene family, member A*, kurz RhoA und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, kurz Rac1. Dabei übt RhoA eine aktivierende und Rac1 eine hemmende Funktion auf PKD aus (Maekawa et al. 1999). Downstream reguliert PKD Cofilin nicht direkt, sondern über eine Reihe von zwischengeschalteten Enzymen. Dies sind die Slingshot-Protein-Phosphatase (SSH), PAK4, LIM Kinase 1 und LIM Kinase 2. Diese Enzyme kontrollieren schließlich die Phosphorylierung von Cofilin (Eiseler et al. 2009; Olayioye et al. 2013; Peterburs et al. 2009). Das Prinzip ist zur Übersicht noch einmal schematisch in *Abbildung 1* dargestellt.



*Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation der Cofilin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung. Die Proteine RhoA und Rac1 üben eine aktivierende, bzw. hemmende Wirkung auf die PKD aus. Diese wiederum aktiviert LIMK2 und LIMK1 (letzteres über PAK4). Zusätzlich verschiebt PKD das Gleichgewicht in Richtung des phosphorylierten Cofilin durch Hemmung von SSH1, welches seinerseits die Dephosphorylierung von Cofilin fördert.
(in Anlehnung an: Maekawa et al. 1999; Eiseler et al. 2009; Olayioye et al. 2013; Peterburs et al. 2009)*

Um die Auswirkungen des Gewebetraumas auf den Organismus und die Rolle der PKD darin zu untersuchen, bietet sich eine Reihe von unterschiedlichen Zelltypen an. Zunächst soll das Grundprinzip der Messung von Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit nach Inhibition der PKD an Zellen der NB4-Zelllinie untersucht werden.

Diese leukämischen Promyelozyten besitzen eine t(15;17)-Translokation, die zu einer Fusion zweier Gene führt, die für den Transkriptionsfaktor *Promyelotic Leucemia-Protein* (PML) und den Retinsäurerezeptor (RAR) kodieren. Es kommt zu einer Histon-vermittelten Unterdrückung der Transkription bestimmter Gene und somit zu einer konstitutiven Blockade der Differenzierung der Immunzelle. Durch die Zugabe von ATRA kann diese Differenzierungsblockade aufgehoben und eine Entwicklung entlang der neutrophilen Entwicklungslinie induziert werden. Der große Vorteil dieser Zelllinie ist, dass sie einerseits in großer Zahl zur Verfügung stehen und andererseits eine niedrige Varianz aufweisen. Nach Differenzierung weisen die NB4-Zellen große Ähnlichkeiten mit menschlichen PMN auf und sind aus diesen Gründen ideal für unsere Untersuchung (Huang et al. 1988; Lanotte et al. 1991). Der Einfluss der PKD soll dabei evaluiert werden, indem ein Teil der Zellen mit spezifischen PKD-Inhibitoren behandelt wird.

Der nächste Schritt dieser Arbeit ist die Übertragung auf ein Tiermodell mit Schweinen, da deren Organismus und Immunsystem große Ähnlichkeiten zum Menschen aufweist (Meurens et al. 2012; Swindle et al. 2012). Hierbei können die Neutrophilen von ein und demselben Organismus zu genau definierten Zeitpunkten untersucht werden, wobei einerseits ein chirurgisches Gewebetrauma, andererseits ein künstlicher hämorrhagischer Schock induziert werden.

Danach wird das Verfahren auf menschliche Neutrophile angewandt. Hierfür werden zunächst Neutrophile von gesunden Spendern und schließlich von Patienten untersucht, die einem Gewebetrauma im Rahmen einer geplanten invasiven Operation ausgesetzt waren. So kann ein individueller Vergleich zwischen dem Zustand vor und nach dem Gewebetrauma hergestellt werden.

Zur Quantifizierung der Migrationsfähigkeit werden in dieser Untersuchung zwei verschiedene Methoden angewandt:

1. Messung der Deformierbarkeit mittels eines Optical Stretchers
2. Messung der transendothelialen Migrationsfähigkeit mittels eines Migrations-Assays

Fragestellung:

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu beschreiben, welche Auswirkungen ein Gewebetrauma auf die Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten hat und wie diese durch die Protein Kinase D moduliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetrakis(acetoxymethyl) ester

ATRA (*all-trans*-Retinsäure)

CRT0066101 (PKD-Inhibitor)

DMSO

EDTA-Stock-Lösung

FCS (Fetales Kälberserum)

fMLP

H₂O, dest.

Hepes-Stock-Lösung

KB NB 142-70 (PKD-Inhibitor)

Maygrünwald-Giemsa

NaCl

NaOH

NH₄Cl

OptiPrep™-Lösung

Penicilin/Streptomycin

PolymorphPrep™-Lösung

Roswell-Park-Institute-Nährmedium 1640

Wright-Giemsa-Stain

2.2 Reagenzien

Solution B:

Auflösen von 0.85 g NaCl in 50 ml H₂O, dann Zugabe von 20 ml Hepes-Stock-Lösung und 1 ml EDTA-Stock-Lösung; Einstellen des pH auf 7,4 mit 1 M NaOH; Schließlich Auffüllen mit H₂O auf 100 ml;

Solution C:

Auflösen von 6% Polysucrose in 0,85% NaCl-Lösung;

Density Solution A:

Mischung von 5 Volumina OptiPrep™-Lösung mit 17 Volumina Solution B

Density Solution B:

Mischung von 8 Volumina OptiPrep™-Lösung mit 22 Volumina Solution B

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Axis-Shield Diagnostics (Dundee, UK)

Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

Tocris Bioscience (Bristol, UK)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Corning Costar Transwell (5µm Porengröße), Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
EDTA-S-Monovetten (7,5ml), Starsted (Nümbrecht, Deutschland)
Einmalspritzen (1ml, 5ml, 10ml), B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (2ml), Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml), Beckton Dickinson (Nürnberg, Deutschland)
Glas-Pasteurpipette (2ml), Brand (Wertheim, Deutschland)
Mikroglaskapillare, Composite Metal Services (Ilkley, UK)
Pipettenspitzen, Starsted (Nümbrecht, Deutschland)
Superfrost®-Objektträger, Gerhard Menzel part of Thermo Fisher Scientific
(Braunschweig, Deutschland)

2.4 Geräte

Brutschrank, Binder (Tuttlingen, Deutschland)
CytoSpin™-Zytozentrifuge, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Infinite 200 Pro, Tecan, Maennedorf, Switzerland
Inverses Mikroskop, Nikon Eclipse Ti, Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
pH-Meter ino Lab pH 720, WTW (Weilheim, Deutschland)
Single Mode Infrarot-Laser YLM-5-1070-LP, IPG Photonics (Bristol, United Kingdom)
Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1-S-R, Thermo Electron Corporation (Osterode,
Deutschland)
Wasserbad, Bender und Hobein (Bruchsal, Deutschland)
Zentrifuge 5415D, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.6 Das Tiermodell

Die vorliegende Untersuchung fand in Kooperation mit dem Sonderforschungsbereich 1149 am Zentrum für Traumaforschung Ulm statt. Ziel des Sonderforschungsbereich ist es, in interdisziplinärer Zusammenarbeit die Pathophysiologie von schweren Traumata auf allen Ebenen, d.h. von der Biochemie über die genetische Translation bis hin zur Klinik zu erforschen. Dadurch sollen bisher wenig verstandene Prozesse während und nach einem Trauma erklärt und mögliche zukünftige Therapieoptionen offengelegt werden.

Da die Migrationsfähigkeit von Immunzellen eine große Rolle bei der Reaktion des menschlichen Körpers auf Traumata spielt und die Erforschung von posttraumatischen Inflammationsprozessen ein Fokus des Sonderforschungsbereichs 1149 ist, fand unsere Untersuchung in Kooperation mit der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung am Zentrum für Biomedizinische Forschung statt, deren Projekt „Hyperoxia after haemorrhagic shock with pre-existing atherosclerosis“ Teil des Sonderforschungsbereichs ist.

Die Haltung der Versuchstiere und die Entnahme der Blutproben erfolgte durch die oben genannte Arbeitsgruppe.

Hauptverantwortlicher des Projekts ist Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher.

30-40% der Mortalität von Traumapatienten ist allein auf Blutverlust zurückzuführen (Kauvar et al. 2006). Vor allem in den späteren Phasen (>48h) des hämorrhagischen Schocks findet eine massive systemische Entzündungsreaktion statt, die vor allem durch Gewebeischämie und erhöhten oxidativen und nitrosativen Stress verursacht wird. Im Rahmen dieser Entzündung kann es zu einem *Systemic Inflammatory Response Syndrom* und schließlich zu Multiorganversagen beim Patienten kommen. Im oben genannten Projekt soll untersucht werden, ob eine 100% Sauerstoffgabe während der Schockphase zu einer Verbesserung der Prognose beiträgt, wie in der Forschung diskutiert wird (Douzinas et al. 2012).

2.6.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Hausschweine der Rasse *Familial hypercholesterolemia bretoncelles meishan* (FBM) verwendet. Die FBM-Rasse wurde als Tiermodell für die Entwicklung von Artherosklerose gezüchtet und zeichnen sich durch eine homozygote LDL-Rezeptor-Mutation aus. Diese Mutation führt dazu, dass die Tiere unter cholesterinhaltiger Diät beschleunigt Atherosklerose entwickeln. Eine Hälfte der Tiere wurde mit Standard-Diät, die andere mit high-fat-Diät versorgt (Thim et al. 2010).

Das durchschnittliche Alter aller Schweine betrug 26,44 Monate, mit einem Minimum von 16 Monaten und einem Maximum von 111 Monaten. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Schweine verwendet.

Verantwortlich für die Züchtung war Prof. Ludovic Drouet, Service d' Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris.

Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag bei 77,33 Kg, mit einem Minimum von 53 Kg und einem Maximum von 103 Kg.

Die Versuchsschweine wurden in Gruppenhaltung auf Einstreu gehalten, wobei in Boxen von 6,2 m² zwei bis drei Tiere untergebracht waren. Dies entspricht den in Anhang A der ETS No. 123 zur Haltung von Wirbeltieren für wissenschaftliche Zwecke festgelegten Vorgaben.

Die Experimente wurden vom Tierforschungszentrum Ulm und dem Regierungspräsidium Baden-Württemberg genehmigt. Die Experimente entsprechen den Vorgaben der EU Direktive 2010/63/EU „Legislation for the protection of animals used for scientific purposes“ (Animal Experiment Approval Number: 1189).

2.6.2 Traumamodell und Versuchsablauf

Es wurde ein Traumamodell entworfen, bei dem je eine atherosklerotisch vorgeschädigte Gruppe und eine gesunde Kontrollgruppe von erwachsene Wild-Typ Schweinen einem induzierten Trauma ausgesetzt werden, das aus zwei Komponenten besteht: Zunächst werden an dem Versuchstier mehrere chirurgische Gefäßzugänge und eine Nierenbiopsie durchgeführt. Dann erfolgt eine Entnahme von ca. 30% des Blutvolumens über einen Zeitraum von 3 h unter ständiger Volumen- und Blutdruckkontrolle.

Anschließend beginnt die 48-stündige „Intensivbehandlung“ des Versuchstiers. Diese besteht aus der Retransfundierung des entnommenen Blutes in 50 ml Boli, einer mechanischer Beatmung (AZV: 8 ml/Kg, PEEP: 10 cmH₂O, I/E-Ratio: 1:1,5, arterieller PCO₂: 35-40 mmHg) und Blutdruckstabilisierung mittels i.v.-Gabe von Kristalloidlösung und Noradrenalin. Die Ventilation mit 100% O₂ erfolgt nur in den ersten 24 h, danach erfolgt eine Ventilation nach Standard-ICU-Guidelines.

Zielvariable ist dabei vor allem die notwendige Noradrenalin-Infusionsrate, um die Prä-Schock-Werte von Blutdruck und Kreatinin-Clearance beizubehalten.

Zum Durchführen unserer Untersuchung wurden den gesunden Schweinen jeweils zweimal 25 ml venösen Blutes in EDTA-Monovetten entnommen. Diese Entnahmen fanden jeweils direkt vor und 12 h nach dem künstlichen hämorrhagischen Schock statt.

2.7 Differenzierung der NB4-Zellen

Die NB4-Zellen wurden im September 2015 von der Leibniz-Institut DSMZ (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) bezogen.

In einem Nährmedium aus RPMI mit 10% FCS und 1% P/S wurden $2 \cdot 10^5$ /ml Zellen ausgesät. Dabei wurde eine Konfluenz von 60-70% in der Kultur erreicht. Am ersten

Tag wurde ATRA in einer Konzentration von 5 μ M hinzugefügt. Am dritten Tag fand eine Zellzählung statt und 5*10⁵ Zellen/ml wurden wieder ausgesät, wobei die Hälfte des Nährmediums gegen frisches, ATRA-haltiges Medium ausgetauscht wurde. Am fünften Tag wurde die Differenzierungseffizienz mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Integrin α -M (CD11b)-Markers überprüft. Anschließend fand die Ernte der differenzierten NB4-Zellen statt.

2.8 Entnahme der humanen PMN

Nach Aufklärung und Zustimmung der Spender, wurden Blutproben (20ml) aus peripheren Venen entnommen. Einbezogen wurden dabei einerseits gesunde Spender, andererseits Patienten des Universitätsklinikum Ulm, jeweils 1 Tag vor und 1 Tag nach einer invasiven Operation. Details zu den Patienten sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

Dies geschah nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Universität Ulm (409/16 und 116/14).

Tab. 1: Auflistung von Patienten und zugehörigen OP-Details, denen im Rahmen unserer Untersuchung Blut entnommen wurde. Aufgeführt sind Geschlecht, Alter, Diagnose, Art und Dauer des Eingriffs.
(in Anlehnung an: Supplemental Table 1, Wille et al. 2018)

Pat. #	Geschlecht	Alter	Diagnose	Art des Eingriffs	Dauer des Eingriffs
1	männlich	74	Kolonkarzinom	Hemikolektomie rechts	142 min
2	männlich	46	Retroperitonealer Schwann-Zell-Tumor	Tumorextirpation	245 min
3	männlich	73	Kolonkarzinom	Tiefe anteriore Rektumresektion	384 min
4	männlich	80	Kolonkarzinom	Sigmoidektomie	167 min
5	weiblich	51	Pankreaskarzinom	Duodenopankreatektomie	316 min
6	weiblich	59	Kolonkarzinom	Hemikolektomie rechts	199 min

2.9 Separation der neutrophilen Granulozyten von Schweinen

Unter sterilen Bedingungen fand die Separation der polymorphkernigen Granulozyten aus dem Schweineblut statt. Bei der Herstellung und Umgang mit den Lösungen und RPMI-16040 wurde stets auf sterile Arbeitsbedingungen geachtet. Zunächst wurde das Blut circa 20 min auf Raumtemperatur gekühlt. Danach erfolgte eine Mischung von 9 Volumina Blut mit 1 Volumen Solution C in einem sterilen Falcon-Gefäß. Für 20-40 Minuten wurde die Mischung bei Raumtemperatur gelagert, damit die Erythrozyten auf den Grund des Röhrchens absinken konnten. Nun wurden die Density Solutions A und B aus OptiPrep™ und Solution B hergestellt. Der Überstand des Blutgemisches wurde in ein separates Falcon-Gefäß gegeben, in das danach 5 ml Density Solution A und 5 ml Density Solution B vorsichtig unterschichtet wurden.

Für 25 min wurde das Gefäß bei 18-20 ° Celsius und 800g zentrifugiert. Nachdem die Zentrifugation abgeschlossen war, zeigte sich eine Bandenauftrennung der enthaltenen Zellen. Im 2. Ring befanden sich die PMN, die nun abpipettiert und in ein weiteres steriles Falcon-Gefäß überführt wurden. Hier wurde die Zellsuspension mit einem entsprechend gleichen Volumen an Solution B verdünnt und für 10 min bei 18-20 ° Celsius und 350g zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet, in dem sich die PMN befanden, in 10 ml RPMI-1640 resuspendiert.

Es folgte eine Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und, je nach Notwendigkeit, die Zugabe von weiterem RPMI-1640, um die ideale Konzentration von 40×10^4 Zellen pro Milliliter zu erreichen.

Um die Morphologie und Reinheit der PMN-Separation auch zu einem späteren Zeitpunkt noch beurteilen zu können, wurde nach jeder Separation ein Zellpräparat hergestellt. Dazu wurden 0,1-0,2 ml Zellsuspension auf einen Superfrost-Objektträger aufgebracht und mit 8g für 10 min in einer CytoSpin Zytozentrifuge zentrifugiert.

Anschließend erfolgte eine Lufttrocknung des Präparats und eine Fixierung mit Methanol. Nach Abschütteln des Methanols wurde das Präparat mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt, die nach 5-8 min wieder abgeschüttelt wurde. Danach erfolgte das Auftragen der Giemsa-Gebrauchslösung für 10 min. Schließlich wurde der Objektträger für 2 min mit Phosphatpuffer abgespült und luftgetrocknet.

2.10 Separation der humanen neutrophilen Granulozyten

Unter sterilen Bedingungen fand die Separation der polymorphkernigen Granulozyten aus den menschlichen Blutproben statt. Bei der Herstellung und Umgang mit den Lösungen und RPMI-16040 wurde stets auf sterile Arbeitsbedingungen geachtet.

Zunächst wurde das Blut circa 20 min auf Raumtemperatur gekühlt. Inzwischen wurde ein steriles Falcon-Röhrchen mit PolymorphPrep™ gefüllt. Im Verhältnis 1:1 wurde das Blut nun vorsichtig auf das PolymorphPrep™ pipettiert, so dass keine Vermischung stattfand.

Eine Zentrifugation der Röhrchen für 35 min mit 500g und 22 ° Celsius fand statt. Derweil wurde in einem Eppendorf-Gefäß eine Mischung 1:1 von Solution C und hypotonem Wasser (Ampuwa®) hergestellt. Nachdem die Zentrifugation abgeschlossen war, zeigte sich eine Bandenauftrennung der enthaltenen Zellen. Im 2. Ring befanden sich die PMN, die nun abpipettiert und in ein weiteres steriles Falcon-Gefäß überführt wurden. Eine weitere Mischung 1:1 aus der hergestellten Lösung und den PMN wurde hergestellt und nochmals zentrifugiert, für 10 min mit 400g und 22 ° Celsius. Schließlich wurde der Überstand abpipettiert und in 10 ml RMPI resuspendiert.

Es folgte wiederum eine Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und die Herstellung eines Zellpräparats (siehe oben).

2.11 Inhibition der PKD

Um die Protein Kinase D in den zu untersuchenden Zellen zu inhibieren, wurden zwei unterschiedliche enzymatische Inhibitoren verwendet. Der Inhibitor CRT0066101, im Folgenden mit CRT abgekürzt, wurde im Jahre 2010 von der Arbeitsgruppe um Kuzhuvelil Harikumar im Rahmen einer Studie zur Rolle der PKD beim Wachstum von Pankreaskarzinomen identifiziert. CRT gilt als der erste PKD-Inhibitor, der oral bioverfügbar ist und dabei eine hohe Spezifität zur PKD besitzt (Harikumar et al. 2010).

Der zweite Inhibitor, kb NB 142-70, im Folgenden mit KB abgekürzt, wurde ebenfalls im Jahre 2010 identifiziert, wobei er aus einer Reihe ähnlicher Substanzen als potentester PKD-Inhibitor hervortat. KB zeigt eine hohe Zytotoxizität und Wachstumshemmung. Weitere Anwendungen in der Forschung und Krebstherapie werden zurzeit untersucht (Lavalle et al. 2010).

Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte für 1h bei 37°, unmittelbar vor der Messung. Es wurden jeweils 5 μM CRT und 10 μM KB verwendet.

2.12 Der Optical Stretcher

Um die relative Deformierbarkeit von neutrophilen Granulozyten und NB4-Zellen zu vergleichen, ist es nötig, eine genau definierte Kraft auf die einzelne Zelle auszuüben. Aufgrund der mikroskopischen Dimensionen, von sowohl den Zellen selbst als auch der zu erwartenden Deformierung, ist dies mit herkömmlichen Mitteln schwer zu erreichen. Der Optical Stretcher nutzt dafür zwei exakt aufeinander gerichtete

divergierende Laserstrahlen, zwischen denen die Zellen zunächst optisch fixiert und dann deformiert werden. So ist eine kontaktfreie Messung der mechanischen Dehnbarkeit der suspendierten Zelle möglich.

Dies bietet den Vorteil, dass die PMN und NB4-Zellen nicht zusätzlich aktiviert oder beschädigt werden, was die Messwerte verfälschen würde.

Der Optical Stretcher basiert auf dem Prinzip des Strahlungsdrucks. Demzufolge kann die Absorption oder Reflexion von elektromagnetischen Wellen Druck auf eine Fläche ausüben. In den 1970er Jahren gelang es Arthur Ashkin, dielektrische Partikel mithilfe eines gaußschen Laserstrahls zu „lenken“. Partikel, die in den Randbereich eines solchen Gauß-Bündels gerieten, wurden mit großer Kraft in den Hochintensitäts-Bereich entlang der Strahlenachse gezogen und von der Laserquelle fortgestoßen. Dies führte Ashkin auf die Wirkung von zwei Kräften zurück, die er als Streukraft und Gradientkraft bezeichnete. Die Gradientkraft zieht den Partikel in den Bereich der größten Feldstärke, die Streukraft stößt ihn in Richtung der Strahlenachse fort. Wurde ein zweiter, gegenläufiger Strahl hinzugefügt, so hoben sich die Kräfte am Schwerpunkt des Partikels auf und er wurde im Strahl fixiert (Ashkin 1970). Dieses Prinzip wird als Optical Tweezer bezeichnet, da es erlaubt, Partikel ähnlich wie mit einer Pinzette festzuhalten. Die erste Anwendung dieses Prinzip zur Fixierung von lebenden Zellen erfolgte, als Ashkin eine Verunreinigung seines Ansatzes mit Bakterien feststellte, die auf gleiche Weise im Strahl festgehalten wurden, da biologische Zellen ebenfalls dielektrische Eigenschaften besitzen.

Durch die hohe Intensität des Lichts wurden die bakteriellen Zellen zunächst zerstört, doch durch Veränderung der Laserintensität gelang es später, unter anderem *Escherichia coli* und Erythrozyten für mehrere Stunden schadlos zu fixieren. Hier wurden bereits eine elastische Verformung der Zellen beobachtet (Ashkin et al. 1987). Diese Deformierung der Zellen entspricht einer Dehnung und keiner Stauchung, wie es aufgrund der Streukraft zu erwarten wäre. Dies liegt in den unterschiedlichen Brechungsindizes der Medien begründet, die der Laserstrahl durchquert.

Zunächst durchquert der Laserstrahl ein wässriges Medium, um dann auf die suspendierte Zelle zu treffen, die einen höheren Index als das umgebende Medium besitzt. Hier wirkt das Momentum des Lichts als Strahlungsdruck und zwar in Richtung des Indexgefälles, d. h. weg von der Zelle. Durch die Ausbreitung innerhalb des optisch dichteren Mediums erhöht sich das Momentum des Lichts. Wenn es auf der anderen Seite der Zelle wieder in ein optisch dünneres, wässriges Medium übergeht, wird dieses Momentum wiederum als Strahlungsdruck auf die Zellgrenzschicht übertragen, ebenfalls fort von der Zelle. Die Streuungskraft, die totale Kraft, die auf den Schwerpunkt der Zelle wirkt, ist also die Differenz zwischen diesen beiden Strahlungsdrücken. Da das Momentum aber direkt an der Zellmembran übertragen wird, sind die lokalen Oberflächenkräfte um ein vielfaches höher als die Streukraft. So wird die Zelle gedehnt.

Im Falle des Optical Stretcher wird die Zelle von zwei exakt gegenläufigen, divergenten Laserstrahlen getroffen, wodurch sich die Streukräfte aufheben, die Oberflächenkräfte an den Membranpolen aber addieren. So bleibt die Zelle in der Schwebe, wird aber an den Polen gedehnt. Da die beiden Laserstrahlen defokussiert sind, erfährt die Zelle dabei keinen Schaden durch die Lichtintensität, der für die Beobachtung relevant ist (Guck et al. 2000). Dieses Prinzip verdeutlicht *Abbildung 2*.

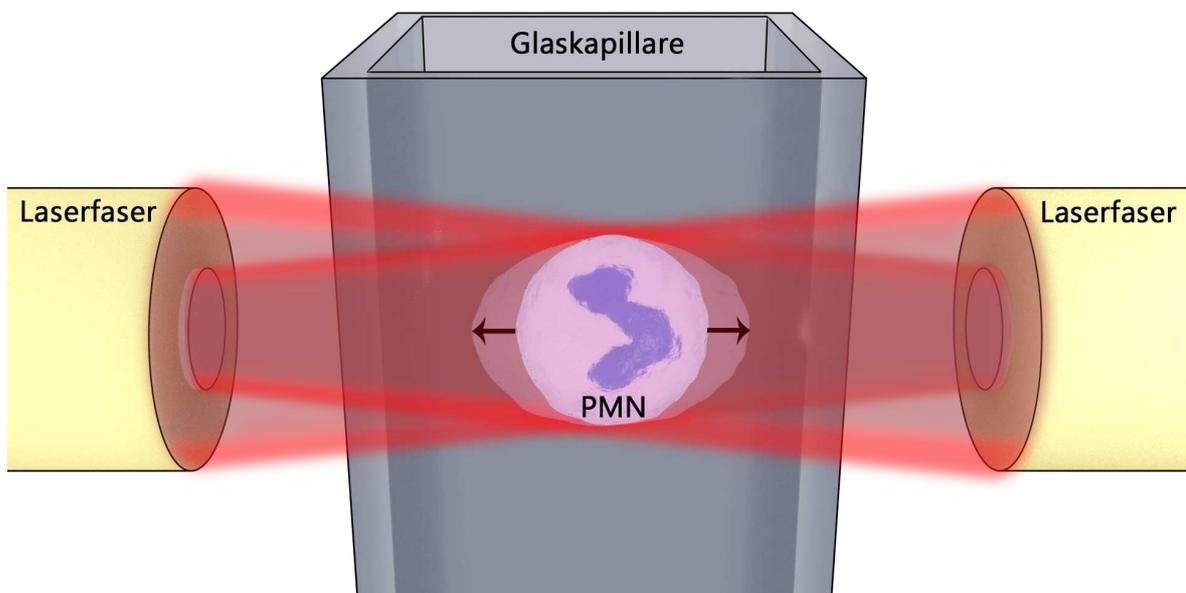


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Messkammer. Der PMN (Polymorphnukleärer Leukozyt) befindet sich in Suspension in einer Glaskapillare, auf die zwei divergente Laserstrahlen ausgerichtet sind. Die Pfeile zeigen die Richtung der Oberflächenkräfte, die auf die Zellmembran wirken.

2.12.1 Aufbau des Optical Stretcher

Der Optical Stretcher besteht aus zwei gekoppelten Systemen: Einem kontinuierlicher Single-Mode Infrarot-Laser mit einer Wellenlänge von 1070 nm und einem mikrofluidischem System, mit dem die Zellen in den Fokus der Laserstrahlung gebracht werden.

Unterhalb der Messkammer ist eine Mikroskop-Kamera positioniert, die die Deformation der Zellen als TIF-Bildsequenz aufzeichnet. Um eine exakte Synchronisation der Laserleistung mit der Bildaufzeichnung zu erreichen, wird ein Controller (M Series Multifunction DAQ) verwendet.

Aufgrund des mikroskopischen Ausmaßes der Zelldeformation ist es nötig, den Versuchsaufbau von mechanischen Erschütterungen zu isolieren, da sonst die Messgenauigkeit beeinträchtigt wird. Dazu ruht der Optical Stretcher auf einem Antivibrations-System (Vibration Isolation System TS-300).

2.12.2 Laser und Messkammer

Der primäre Laserstrahl wird mittels eines Strahlenteilers in zwei gleichwertige Strahlen gespalten und auf zwei optische Fasern aufgeteilt. Die Enden dieser Fasern sind exakt kollinear und gegenläufig auf eine Glaskapillare mit der Wanddicke 0.04 mm und dem Innendurchmesser 0.08 mm ausgerichtet. Die mikrofluidische Kapillare ist, zusammen mit den optischen Fasern, auf einem Objektträger fixiert und bildet die sogenannte Messkammer.

Lasersicherheit:

Der verwendete Laser entspricht der Laserklasse 4. Es wurden vor und während der Durchführung der Experimente die aktuellen Regelwerke zur Lasersicherheit und Unfallverhütungsvorschriften umgesetzt.

2.12.3 Mikrofluidisches System

Eine exakte Ausrichtung der Elemente ist essentiell für den Versuch. Schon eine Abweichung von einem Bruchteil eines μm verfälscht die Messungen. Aus diesem Grund, und um eine serielle Messung zu ermöglichen, werden die Zellen nicht manuell, sondern mithilfe eines mikrofluidischen Systems in den Messbereich des Optical Stretchers eingebracht. Dazu sind die Enden der Kapillare mit zwei Schläuchen verbunden, die für den Zu- und Abtransport der Suspension sorgen. Es ist wichtig, dass die zu messenden Zellen permanent in einer wässrigen Suspension vorliegen, um sie in einem natürlichen, nicht-adhärenen Zustand zu halten. Das mikrofluidische System teilt sich also in zwei Hälften: vor dem Messbereich und nach dem Messbereich, verbunden durch die Glaskapillare. An beiden Enden des Schlauchsystems befindet sich jeweils ein Reservoir, das mithilfe eines Schraubsystems am Versuchsaufbau befestigt ist und dessen Höhe per Hand verstellbar ist. Somit kann der Experimentator während des Versuchs das hydrostatische Gleichgewicht des Systems verändern und den Zellfluss in Richtung und Geschwindigkeit beeinflussen. Steht das Ablauf-Reservoir niedriger als das Zulauf-Reservoir, so fließt die Suspension im Schlauchsystem in Richtung des Ablaufs und führt die Zellen durch die Messkammer, zwischen den kollinear ausgerichteten Laserfasern hindurch. Der gesamte Aufbau ist in *Abbildung 3* verdeutlicht:

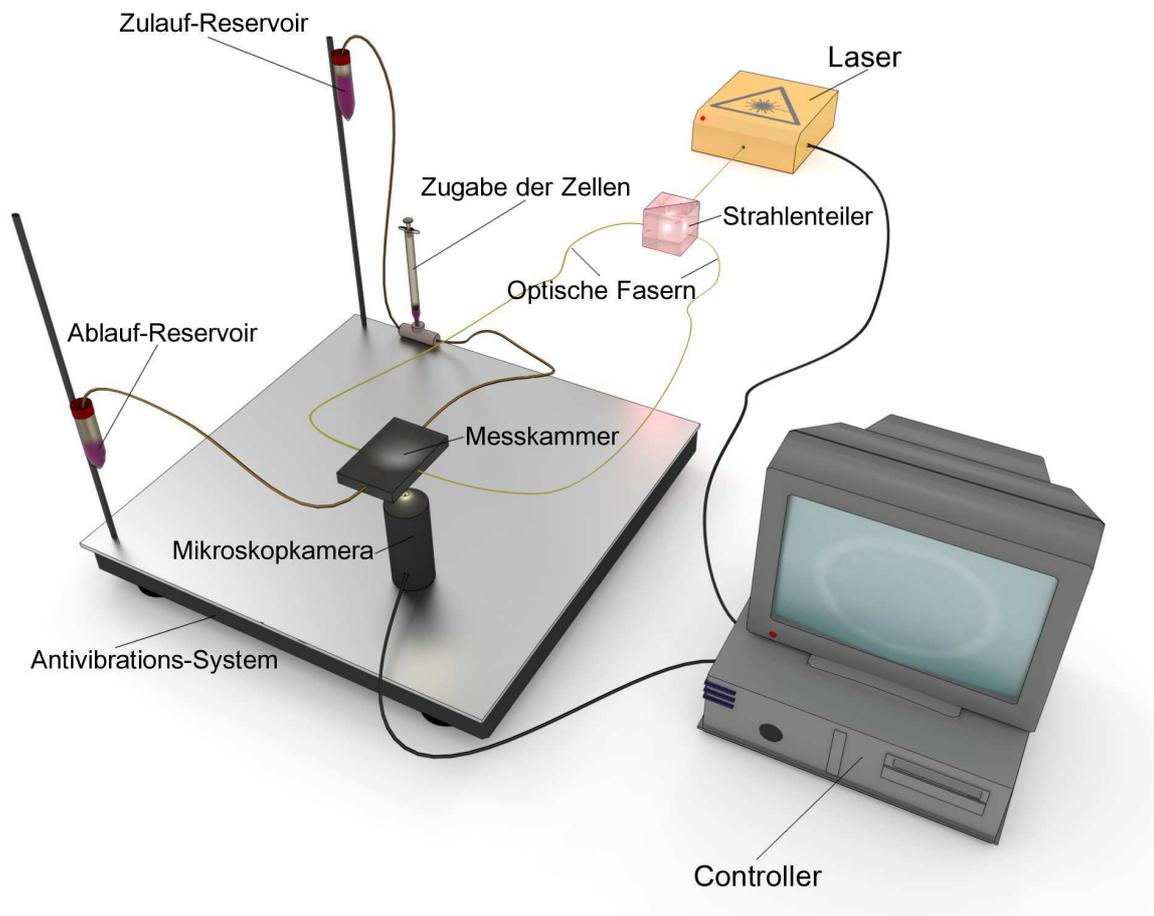


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Optical Stretcher. Laser und Mikroskopkamera werden mithilfe eines Controllers computergestützt synchronisiert.

2.12.4 Ablauf der Messung im Optical Stretcher

Eine sorgfältige Spülung des Systems vor und nach jeder Messung verhindert, dass die PMN oder NB4-Zellen durch Verunreinigungen aktiviert werden. Dies würde zu einem Umbau ihres Zytoskeletts und einer veränderten Dehnbarkeit führen.

Zunächst wurden sowohl die beiden Reservoirs, als auch das Schlauchsystem und die Glaskapillare mit RPMI-1640 gefüllt, um den Zellen während der Messung ein möglichst natürliches Medium zu bieten.

Die Zellsuspension wurde nicht auf einmal, sondern in Schüben von 0,1 - 0,2 ml im Laufe der Messung eingebracht. So konnte eine optimale Zelldichte erreicht werden. Dem hydrostatischen Gleichgewicht folgend, flossen die Zellen in Richtung Ablauf und erreichten die Messkammer.

Mithilfe des oben beschriebenen Prinzips des „Optical Trapping“ konnte nun eine einzelne, lebendige Zelle, die sich exakt im Bereich der beiden defokussierten Laserstrahlen befand, festgehalten werden. Der Laser wurde dazu auf eine Leistung von 0,5 Watt eingestellt. Der Fluss der Suspension wurde gestoppt, da sonst unfixierte Zellen in den Messbereich treiben und die Messung beeinträchtigen könnten.

Zur eigentlichen Messung, dem „Optical Stretching“, wurde nun die Bildaufzeichnung gestartet und die Zelle zunächst für 1 Sekunde im fixierten Zustand belassen. Dann wurde die Leistung des Lasers für 2 Sekunden auf 3 Watt erhöht, wodurch die Zelle gedehnt wird. Schließlich wurde die Relaxation für weitere 2 Sekunden bei 0,5 Watt beobachtet.

Anschließend wurde das Trapping beendet und die nächste Zelle konnte eingefangen werden.

Mit diesem Aufbau konnten im Optical Stretcher zwischen 80 und 100 Zellen pro Stunde seriell gemessen werden. Auf diese Weise wurde für jeden Versuchsansatz eine hohe Zahl an Einzelmessungen generiert. Der Experimentator beobachtet das Bild der Mikroskopkamera über einen Monitor und kann auf diese Weise den Ablauf der Messung exakt steuern.

Für die Analyse der durch die Kamera während des Stretching-Vorgangs aufgenommenen Bilder, wurden die TIF-Sequenzen mittels eines auf der Entwicklungsumgebung LabView basierenden semiautomatischen Bildanalyseprogramms ausgewertet. Dabei wurden die hell-dunkel-Kontraste der Plasmamembran im Strahlengang der Laserfasern detektiert und bei jeder Messung der Betrag der Auslenkung der Plasmamembran im Rahmen des Stretching-Vorgangs (Deformation) protokolliert. Die in den Diagrammen angegebenen Deformationswerte zeigen jeweils die relative Deformation der einzelnen Zelle in Relation zu ihrer Ausgangsgröße (Guck et al. 2001; Lautenschläger et al. 2009; Paschke et al. 2013).

2.13 Messung der transendothelialen Migrationsfähigkeit

Um neben der passiven Deformierbarkeit auch die aktive Deformierbarkeit, sprich Migrationsfähigkeit, zu bestimmen, wird eine Methode verwendet, die in den Sechziger Jahren von Stephen Boyden entwickelt wurde. Hierbei unterteilte er ein Zellkulturgefäß mittels Filtermembran in mehrere Kompartimente. Im Start-Kompartiment befanden sich PMN, im Ziel-Kompartiment eine Tuberkulin-Lösung als Lockstoff. Boyden beobachtete, dass die PMN abhängig von der Tuberkulin-Konzentration, in unterschiedlichem Maße über die Membran wanderten. Somit konnte ihre chemotaktische Migrationsfähigkeit gemessen werden (Boyden 1962).

Für unsere Messung war es wichtig, den Übertritt der PMN vom Gefäß in das Interstitium zu simulieren. Zur Simulation einer Gefäßwand wurden Endothelzellen von menschlichen Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet. 10.000 HUVECs (ebenfalls bezogen von der Leibniz-Institut DSMZ) wurden in Corning Costar Transwell-Zellkultureinsätze 72h vor dem Experiment eingebracht. Die Membranen der Zellkultureinsätze besaßen eine Porengröße von 5 μm . Alle 24h wurde das

Zellkulturmedium ausgetauscht, bis sich eine vollständige Monolage aus differenzierten HUVECs ausgebildet hat. PMN und NB4-Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit DMSO oder PKD-Inhibitoren inkubiert und zusätzlich mit 2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-acetoxymethyl-Ester markiert. Zur Chemotaxis wurde N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) verwendet, welches mit Phenolrot-freiem RPMI verdünnt und in die untere Kammer der Zellkultureinsätze eingebracht wurde.

Zur Durchführung des Experiments wurden 10^6 differenzierte NB4-Zellen und 350.000 PMN ausgesät. Nach 120 min für die PMN und 16 h für die NB4-Zellen wurde dem Medium im unteren Kompartiment der Zellkultureinsätze eine Menge von 200 μ l entnommen, um die relativen Fluoreszenz-Intensitäten zu bestimmen. Hierfür wurde ein Mikroplate Reader (Infinite 200 Pro) verwendet. Diese Messungen wurden nicht vom Autor, sondern von anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Der schematische Versuchsansatz ist in *Abbildung 4* dargestellt.

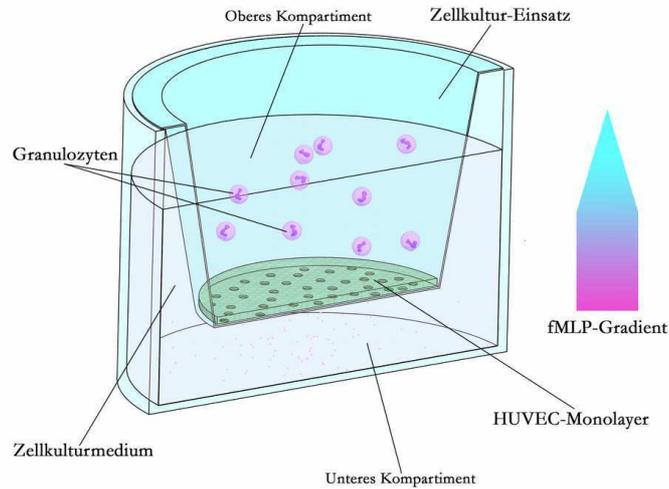
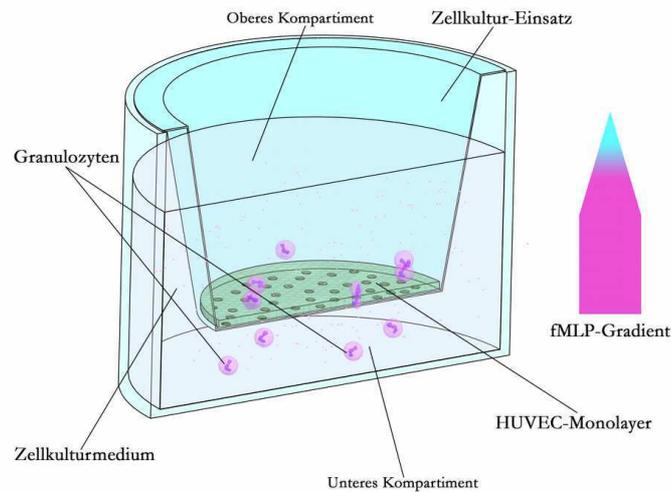
T_0  T_1 

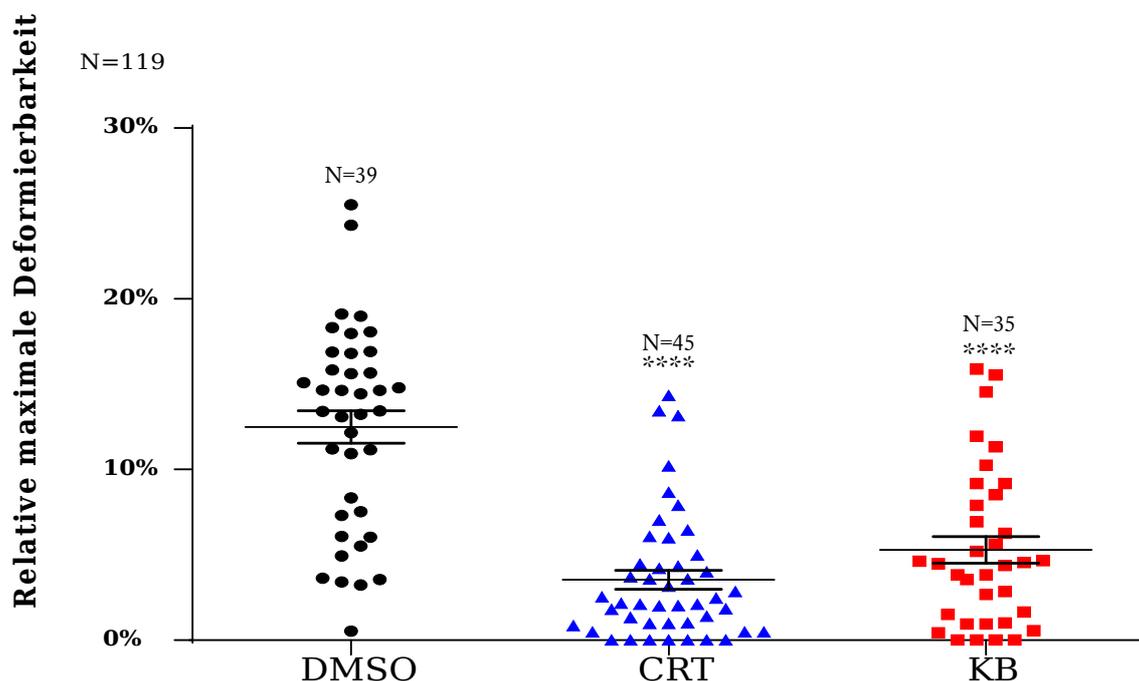
Abb. 4: Der schematische Aufbau der Migrationskammer. Ins obere Kompartiment werden PMN (Polymorphkernige Leukozyten) eingebracht, ins untere Kompartiment der Lockstoff fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine). Der Pfeil rechts gibt die Richtung des fMLP-Gradienten an. Im Zeitraum zwischen T_0 und T_1 wandert eine bestimmte Anzahl von PMN über die Monolage aus HUVECs (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen, grün) und durchquert die $5\ \mu\text{m}$ -Poren, wobei sie dem fMLP-Gradienten folgen. Die Zahl der Zellen, die bis T_1 der Übertritt gelungen ist, hängt von der spezifischen Migrationsfähigkeit der untersuchten PMN ab. Zur Quantifizierung wurden die PMN im Vorhinein fluoreszenzmarkiert.

2.2 Statistik

Zur statistischen Auswertung unserer erhobenen Daten verwendeten wir eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*). Dies bietet sich an, da unsere Untersuchung den Einfluss des artifiziellen Gewebetraumas auf die abhängige Variable, die relative maximale Deformierbarkeit der PMN über mehrere Gruppen hinweg vergleicht. Zur Anpassung des alpha-Niveaus wurde die Dunnett-Prozedur (*Dunnett's multiple comparison test*) angewandt. Dabei ist in den Graphen jeweils der Standardfehler und die statistische Signifikanz angegeben, letztere wird durch die Zahl der Asteriske quantifiziert (siehe Legende der Graphen). Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software Prism 6.00 für Windows von GraphPad Software, San Diego, USA.

3. Ergebnisse

Im ersten Schritt wurde die Deformierbarkeit von differenzierten NB4-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in *Abbildung 5* dargestellt. Hier wurden zwei verschiedene Inhibitoren der Protein Kinase D verwendet, mit denen die NB4-Zellen für 1 h bei 37 ° C inkubiert wurden. Im Vergleich dazu ist die Kontrollgruppe mit funktionstüchtiger Protein Kinase D aufgeführt. Auf der Ordinate ist die Abweichung vom ursprünglichen Durchmesser in Prozent abgebildet.



*Abb. 5: Deformierbarkeit von differenzierten, Protein Kinase D-inhibierten NB4-Zellen (Promyelozytenleukämie-Zellen) als Scatterplot. Es ist ein Vergleich der Werte für drei Gruppen dargestellt: Die Kontrollgruppe (DMSO: Dimethylsulfoxid) und die Gruppen, die mit zwei unterschiedlichen Protein Kinase D-Inhibitoren inkubiert wurden, CRT (CRT0066101) und KB (kb NB 142-70). Es wurden insgesamt N=119 Zellen berücksichtigt. Der Standardfehler ist jeweils eingezeichnet. Es wurden jeweils 5 μ M CRT und 10 μ M KB verwendet. Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunnett-Tests. ****-p-Wert < 0,0001. (in Anlehnung an: Figure 4B, Wille et al. 2018)*

In der statistischen Auswertung zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den jeweiligen Inhibitorgruppen. Vergleicht man jedoch die Inhibitoren CRT und KB miteinander, so zeigt sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe *Dunett's multiple comparison test*.

Um auch eine Aussage über die tatsächliche transendotheliale Migrationsfähigkeit der NB4-Zellen treffen zu können, wurden Messungen mit Migrationsessays durchgeführt, deren Ergebnisse in *Abbildung 6* gezeigt werden. Zusätzlich wurden hier auch nicht-differenzierte NB4-Zellen zum Vergleich in die Messung einbezogen. Ein Messintervall von 16 h wurde gewählt. Es zeigt sich, dass sowohl differenzierte als auch nicht-differenzierte NB4-Zellen dem fMLP-Gradienten folgen und das simulierte Endothel durchwandern, die differenzierten NB4-Zellen jedoch in deutlich höherem Maße. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die PKD-inhibierten NB4-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer migrieren.

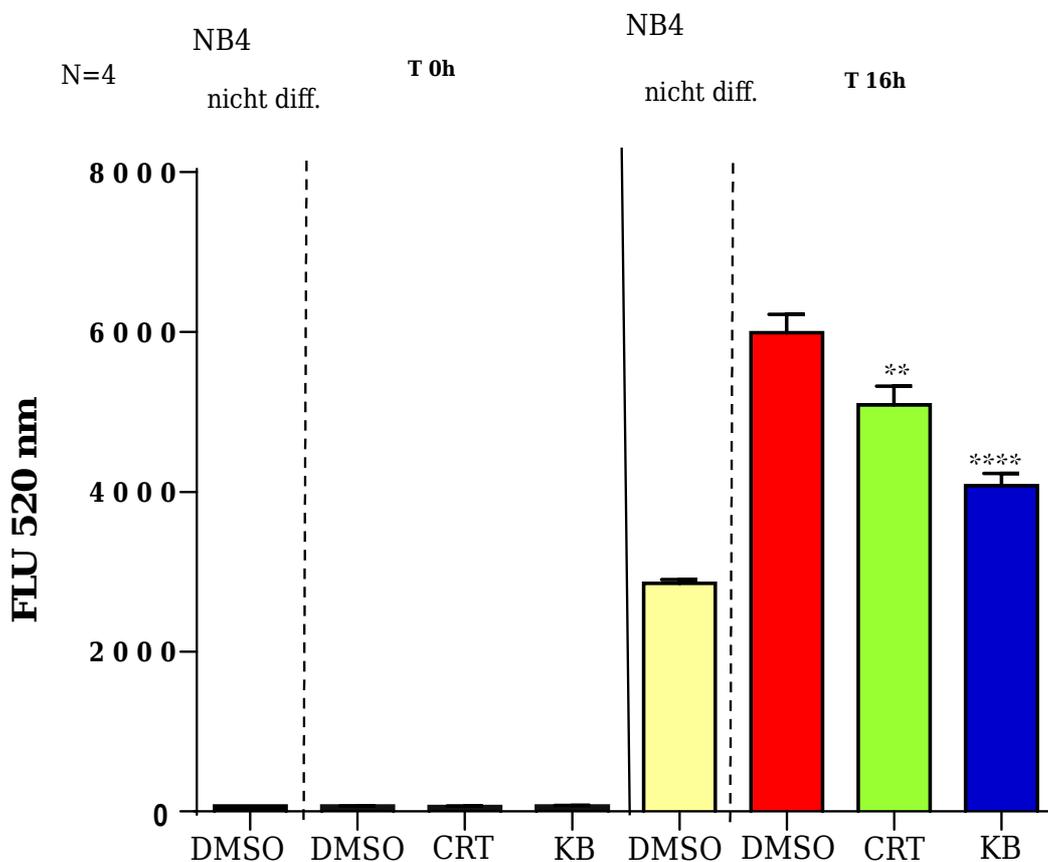


Abb. 6: Migrationsfähigkeit von Protein Kinase D-inhibierten NB4-Zellen (Promyelozytenleukämie-Zellen). Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten im Ziel-Kompartiment der Messkammern. Messungen fanden jeweils nach 0 h und 16 h statt. Auf der Ordinate ist die relative Intensität der Fluoreszenz angegeben. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Zellgruppen: Kontrollgruppe (DMSO, nicht differenziert und differenziert) und die unterschiedlich Protein Kinase D-Inhibierten Gruppen (CRT und KB, differenziert) zu den beiden Zeitpunkten an. Insgesamt wurden $N = 4$ Ansätze und 10^6 Einzelzellen gemessen. Es ist jeweils der Standardfehler eingezeichnet.

Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunnett-Tests. Verglichen wurden CRT (CRT0066101) und KB (kb NB 142-70) mit DMSO (Dimethylsulfoxid) zum Zeitpunkt $T = 16h$. **-p-Wert $< 0,01$; ****-p-Wert $< 0,0001$.

(in Anlehnung an: Figure 4D, Wille et al. 2018)

Im nächsten Schritt wurde das obige Verfahren auf ein Tiermodell mit Schweinen übertragen. Zur Messung der Deformierbarkeit der Schweine-PMN fanden für jedes Schwein zwei Messungen statt: die erste Messung unmittelbar vor dem künstlichen Gewebetrauma, die zweite 12 h danach. In *Abbildung 7* ist der Verlauf der Deformierbarkeit aller PMN der einzelnen Versuchstiere dargestellt.

Die Messung lässt sich in drei Phasen einteilen, in denen die Zellen jeweils mit einer bestimmten Laserleistung gedehnt wurden. Zunächst verbleibt die Zelle in der *Trapping-Phase*, in der sie durch 0,5 Watt in ihrer Position in der Messkammer fixiert wird. Es folgt die zweisekündige *Stretching-Phase* mit 3 Watt, gefolgt von einer ebenfalls zweisekündigen *Relaxations-Phase* mit 0,5 Watt. Es ist zu erkennen, dass die Deformation der PMN in der Trapping-Phase unter 2% des Ursprungswertes schwankt, sich aber ab dem Beginn der Stretching-Phase stark erhöht. Nach Ende der zweisekündigen Stretching-Phase relaxieren die Zellen und der Zelldurchmesser erniedrigt sich wieder.

Die Kurven der einzelnen Versuchsschweine untereinander verlaufen im Vergleich unterschiedlich, jedoch liegt die postshock-Gruppe stets über der preshock-Gruppe, das heißt, die PMN sind leichter zu deformieren, nachdem das entsprechende Tier einem Gewebetrauma ausgesetzt wurde.

Die Mediane der relativen maximalen Deformierbarkeit der beiden Gruppen liegen bei 3,6% in der preshock-Gruppe und 6,1% in der postshock-Gruppe. In beiden Gruppen erfolgt eine im Vergleich zur Dehnung, langsame Relaxation und der Durchmesser der Zelle kehrt im Messzeitraum nicht mehr auf das Ausgangsniveau zurück.

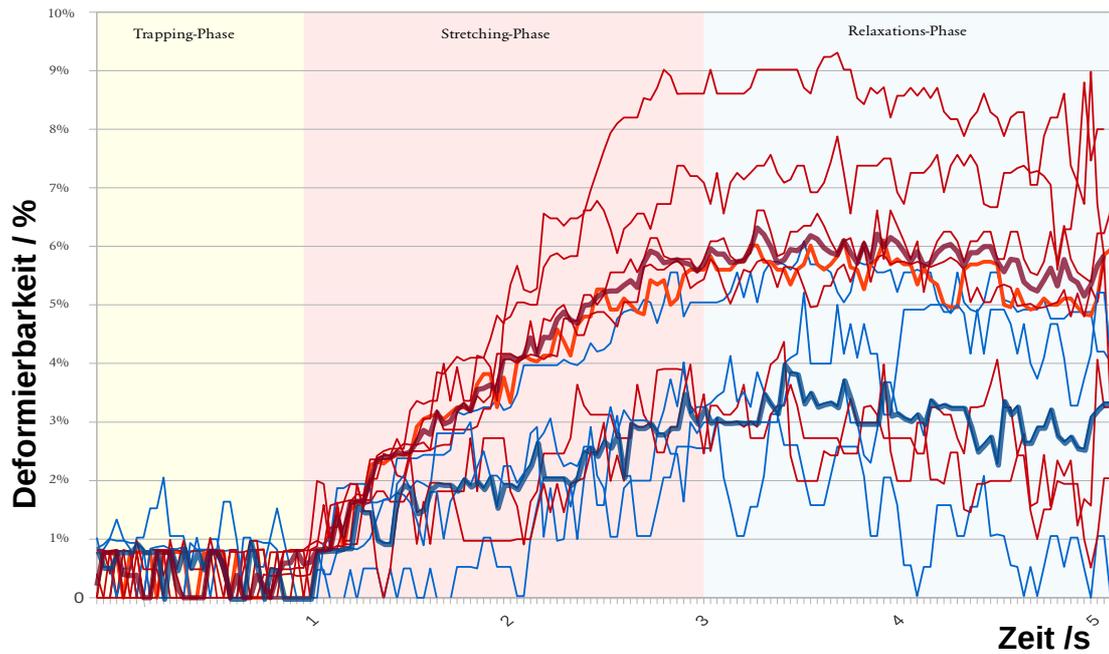


Abb. 7: Prä- und Postschock-Deformierbarkeit von Schweine-PMN (Polymorphkernige Leukozyten), jeweils 12 h vor und nach Gewebetrauma, wobei die Präshock-Gruppe in blau, die Postschock-Gruppe in rot dargestellt ist. Die dicken Kurven stellen den Verlauf der jeweiligen Mediane der Zelldeformierbarkeit aller Versuchstiere der beiden Gruppen da.

In *Abbildung 8* ist die relative maximale Deformierbarkeit aller Schweine-PMN zu beiden Zeitpunkten in Prozent des ursprünglichen Durchmessers aufgeführt. Dabei fließen in die preshock-Gruppe N=74 Einzelzellen, in die postshock-Gruppe N=105 Einzelzellen ein, die kumuliert von 5 verschiedenen Versuchsschweinen stammen.

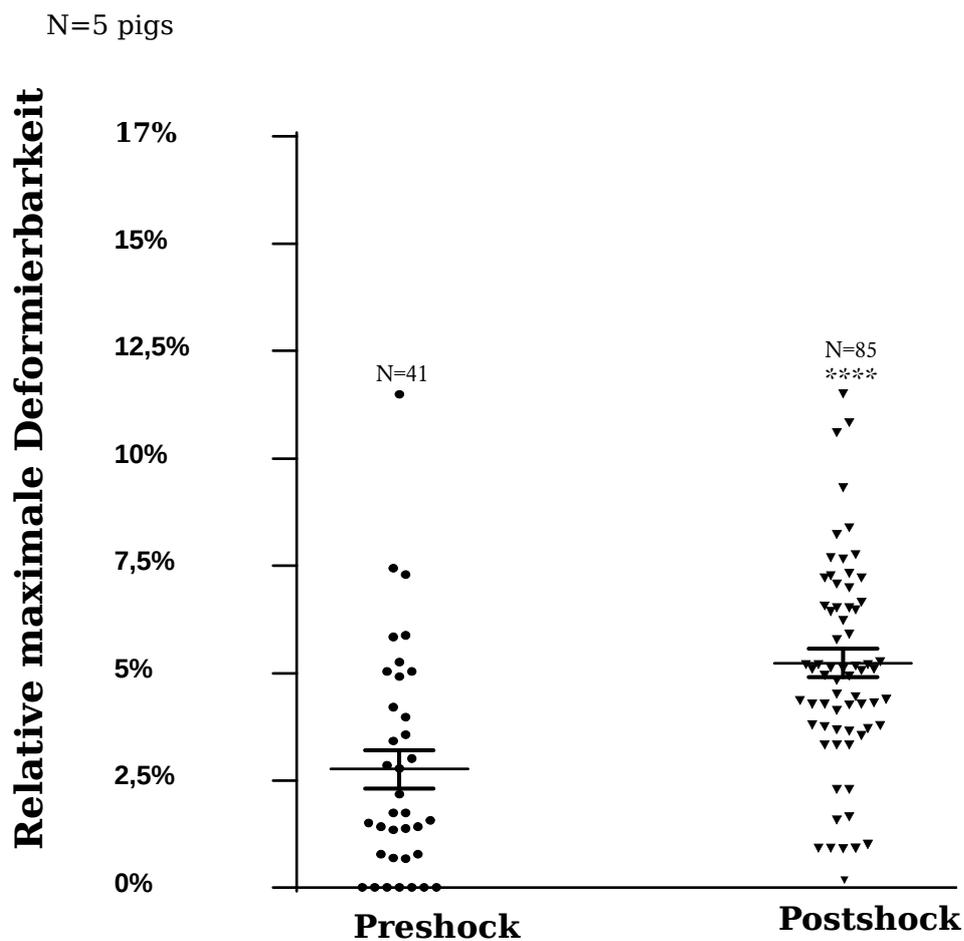


Abb. 8: Vergleich der relativen maximalen Deformierbarkeiten von Schweine-PMN (Polymorphkernige Leukozyten) vor- und 12 h nach Gewebetrauma als Scatterplot. In der preshock-Gruppe sind 74 PMN und in der postshock Gruppe 105 PMN von insgesamt 5 Schweinen kumuliert. Es ist jeweils die durchschnittliche Deformierbarkeit in Prozent des ursprünglichen Durchmessers angegeben. Der Standardfehler ist jeweils eingezeichnet. Insgesamt wurden N=126 Einzelzellen berücksichtigt.

Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunnett-Tests. ****p-Wert < 0,0001.
(in Anlehnung an: Figure 6A, Wille et al. 2018)

Die unterschiedlichen Gruppengrößen liegen darin begründet, dass in jedem Versuchsansatz mehrere PMN durch Messfehler, zum Beispiel Impulsverlust durch Rotation oder Zellyse, ausfallen.

Die durchschnittliche maximale relative Deformierbarkeit der PMN preshock-Gruppe beträgt 2,6%, in der postshock-Gruppe liegt sie bei 4,9%.

Vergleicht man nun die beiden Gruppen, so zeigt sich, dass die PMN zwölf Stunden nach Gewebetrauma also im Durchschnitt um 2,3% dehnbarer sind als vorher. Die Deformierbarkeit hat sich also um den Faktor 1,9 vergrößert. Der Standardfehler beträgt hierbei 0,3%.

Die statistische Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe von *Dunett's multiple comparison test*. Dabei ergibt sich seine statistische Signifikanz von $p > 0,0001$.

Ebenfalls gemessen wurde der Einfluss der PKD-Inhibitoren auf Schweine-PMN, jeweils vor und nach Gewebetrauma. Die Ergebnisse der entsprechenden Messungen sind in *Abbildung 9* dargestellt.

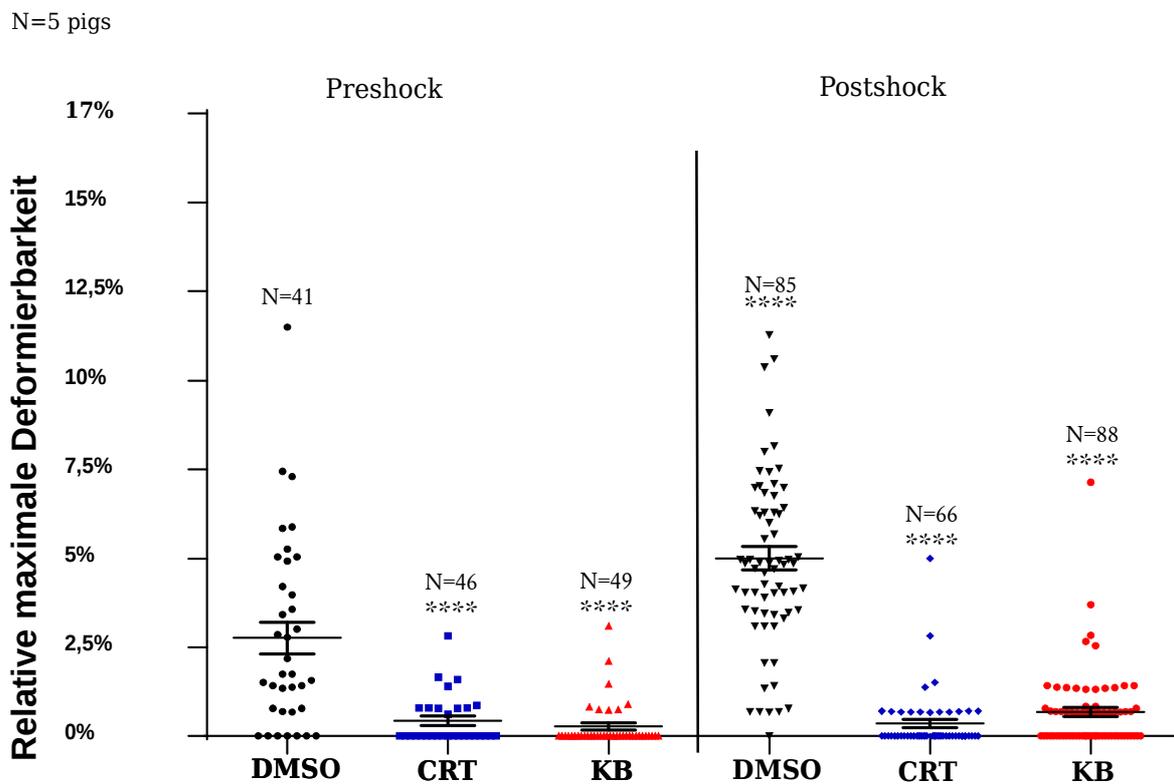


Abb. 9: Darstellung der relativen maximalen Deformierbarkeit von Protein Kinase D-inhibierten Schweine-PMN (Polymorphkernige Leukozyten) vor und 12h nach Gewebetrauma. Auf der Ordinate ist die Deformierbarkeit der PMN in Prozent des ursprünglichen Durchmessers aufgetragen. Die einzelnen Gruppen, unterteilt nach PKD-Inhibitor (CRT: CRT0066101, KB: kb NB 142-70, Kontrollgruppe DMSO: Dimethylsulfoxid) und Zeitpunkt, sind auf der Abszisse aufgetragen. Der Standardfehler ist jeweils eingezeichnet.

Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunnett-Tests. ****p-Wert < 0,0001.
(in Anlehnung an: Figure 6A, Wille et al. 2018)

Vergleicht man nun in der preshock-Gruppe zwischen den Zellen der Kontrollgruppe und CRT-inhibierten Zellen, so ergibt sich ein Unterschied in der durchschnittlichen Deformierbarkeit von 2,3%, mit einem Standardfehler von 0,4%. Der Unterschied zwischen Kontrolle und KB ergibt einen Wert von 2,4%, mit einem Standardfehler von 0,4%.

Es lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Deformierbarkeiten der Zellen der einzelnen Gruppen feststellen. Wie bereits oben dargestellt, besteht auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe Dunett's multiple comparison test.

Die in *Abbildung 10* dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die postshock-PMN in hohem Maße dem fMLP-Gradienten folgen und durch das simulierte Endothel migrieren. Außerdem ist ersichtlich, dass die PKD-inhibierten Zellen zum Zeitpunkt $T = 120$ min in signifikant geringerem Maße durch die HUVEC-Monolage und Membranporen gewandert sind, als die unbehandelte Kontrollgruppe.

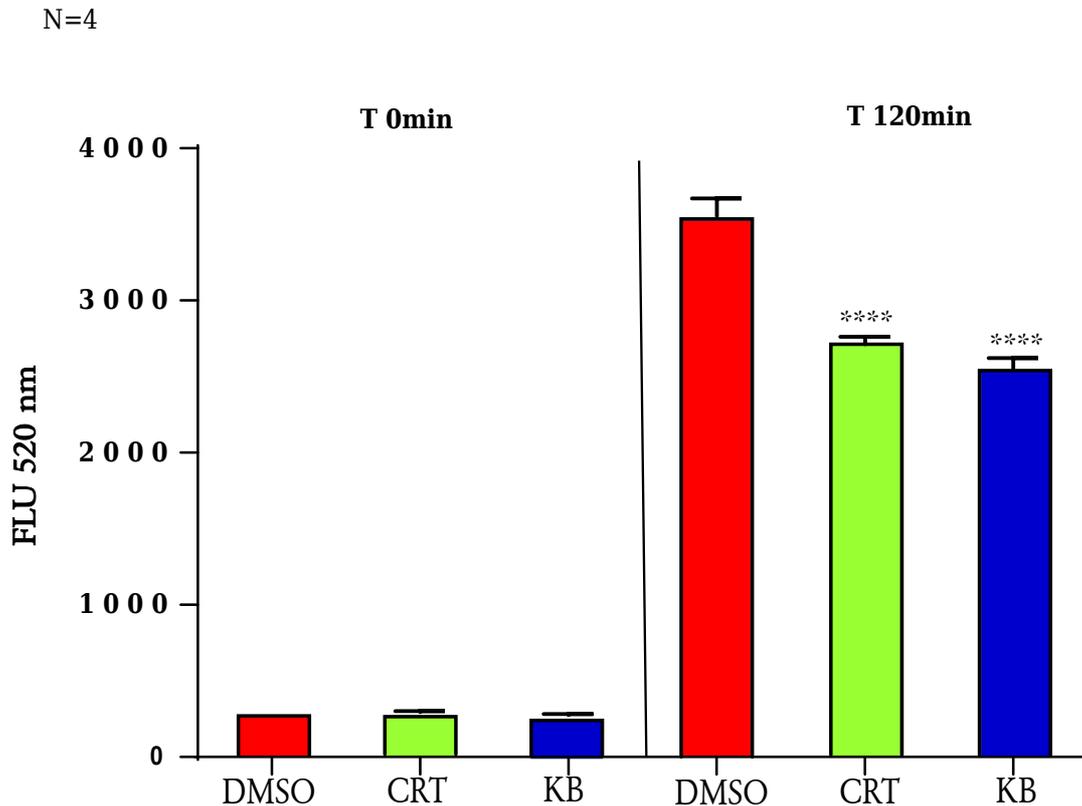
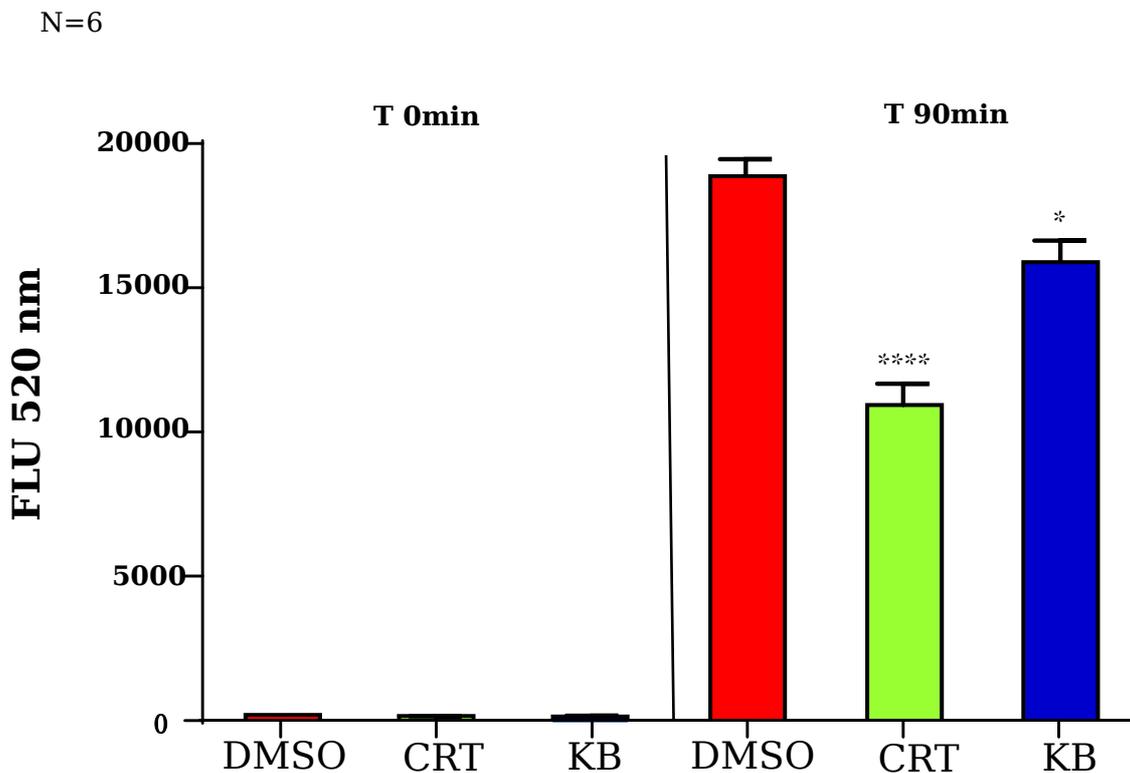


Abb. 10: Migrationsfähigkeit von Protein Kinase D-inhibierten Schweine-PMN (Polymorphkernige Leukozyten). Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten im Ziel-Kompartiment der Messkammern. Messungen fanden jeweils nach 0 Minuten und 120 Minuten statt. Auf der Ordinate ist die relative Intensität der Fluoreszenz (FLU bei einer Wellenlänge von 520 nm) angegeben. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Zellgruppen: Kontrollgruppe (DMSO) und die unterschiedlich Protein Kinase D-Inhibierten Gruppen (CRT und KB) zu den beiden Zeitpunkten an. Insgesamt wurden N=4 Ansätze mit 350.000 Einzelzellen gemessen. Es ist jeweils der Standardfehler eingezeichnet. Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunett-Tests. Verglichen wurden CRT (CRT0066101) und KB (kb NB 142-70) mit DMSO (Dimethylsulfoxid) zum Zeitpunkt T=120min. ****p-Wert < 0,0001. (in Anlehnung an: Figure 6B, Wille et al. 2018)

Im nächsten Schritt wurde die Migrationsfähigkeit humaner PMN von gesunden Spendern gemessen. Es zeigt sich ein Ergebnis analog zu den Experimenten mit NB4-Zellen und Schweine PMN. Die Zellen folgen dem fMLP-Gradienten durch die simulierte Zellwand, wobei die PKD-inhibierten PMN im Vergleich zur Kontrollgruppe in signifikant geringerem Ausmaß übertreten. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen mit NB4-Zellen und Schweine-PMN bewirkt der Inhibitor CRT bei humanen PMN eine stärkere Hemmung der Migration. Die Ergebnisse sind in *Abbildung 11* dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe *Dunett's multiple comparison test*.



*Abb. 11: Migrationsfähigkeit von Protein Kinase D-inhibierten humanen PMN (Polymorphkernige Leukozyten). Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten im Ziel-Kompartiment der Messkammern. Messungen fanden jeweils nach 0 min und 90 min statt. Auf der Ordinate ist die relative Intensität der Fluoreszenz (FLU bei einer Wellenlänge von 520 nm) angegeben. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Zellgruppen: Kontrollgruppe (DMSO, für T 0 min und T 90 min) und die unterschiedlich PKD-Inhibierten Gruppen (CRT und KB, differenziert) zu den beiden Zeitpunkten an. Insgesamt wurden N = 6 Ansätze mit 10^6 Einzelzellen gemessen. Es ist jeweils der Standardfehler eingezeichnet. Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunett-Tests. Verglichen wurden CRT (CRT0066101) und KB (kb NB 142-70) mit DMSO (Dimethylsulfoxid) zum Zeitpunkt T = 16h. *p-Wert < 0,1; ****p-Wert < 0,0001.*

(in Anlehnung an: Figure 5B, Wille et al. 2018)

Schließlich wurde das Verfahren auf humane PMN von Patienten übertragen. Insgesamt wurde Blut von 6 Patienten entnommen, jeweils 1 Tag vor und nach einem invasiven chirurgischen Eingriff. Es zeigt sich, analog zu den Untersuchungen an den Schweine-PMN, dass die Deformierbarkeit nach OP, im Vergleich zu vorher, signifikant zunimmt, nämlich um 1,6% mit einem Standardfehler von 0,2%. Dieser Effekt kann auch hier durch eine Inhibition der PKD unterdrückt werden (siehe *Abbildung 12*). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe *Dunett's multiple comparison test*.

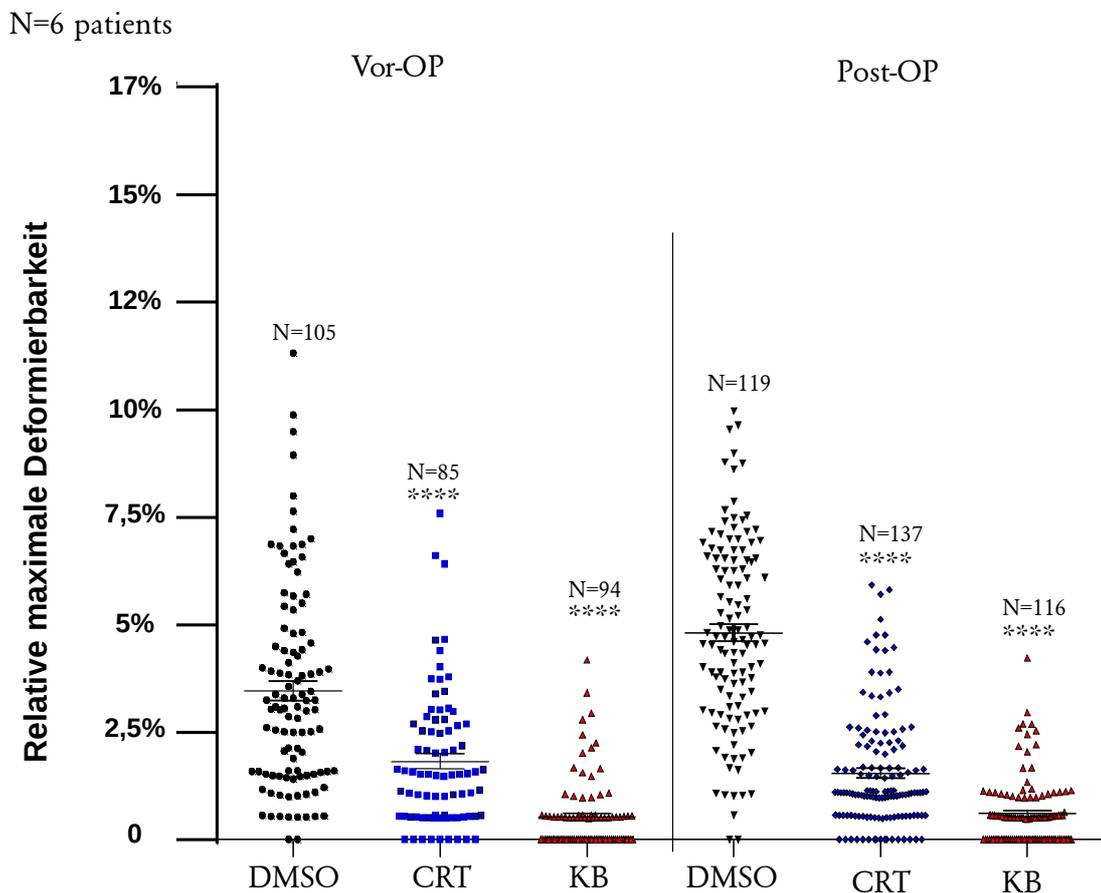


Abb. 12: Darstellung der relativen maximalen Deformierbarkeit von Protein Kinase D (PKD)-inhibierten Gewebetraumapatienten-PMN (Polymorphnukleäre Leukozyten) 1 Tag vor und nach OP. Die einzelnen Gruppen, unterteilt nach PKD-Inhibitor (CRT: CRT0066101, KB: kb NB 142-70 und Kontrollgruppe DMSO: Dimethylsulfoxid) und Zeitpunkt, sind auf der Abszisse aufgetragen. Der Standardfehler ist jeweils eingezeichnet. Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunett-Tests. ****-p-Wert < 0,0001. (in Anlehnung an: Figure 6C, Wille et al. 2018)

Auch für die Patienten-PMN nach Gewebetrauma wurde die Migrationsfähigkeit bestimmt. Das Ergebnis ist in *Abbildung 13* dargestellt. Es zeigt sich, dass die PKD-inhibierten PMN auch hier in signifikant geringerem Ausmaß ins Zielkompartiment wandern. Wie auch bei den PMN von gesunden Spendern, zeigt sich auch hier eine stärkere Hemmung der Migrationsfähigkeit durch CRT als durch KB.

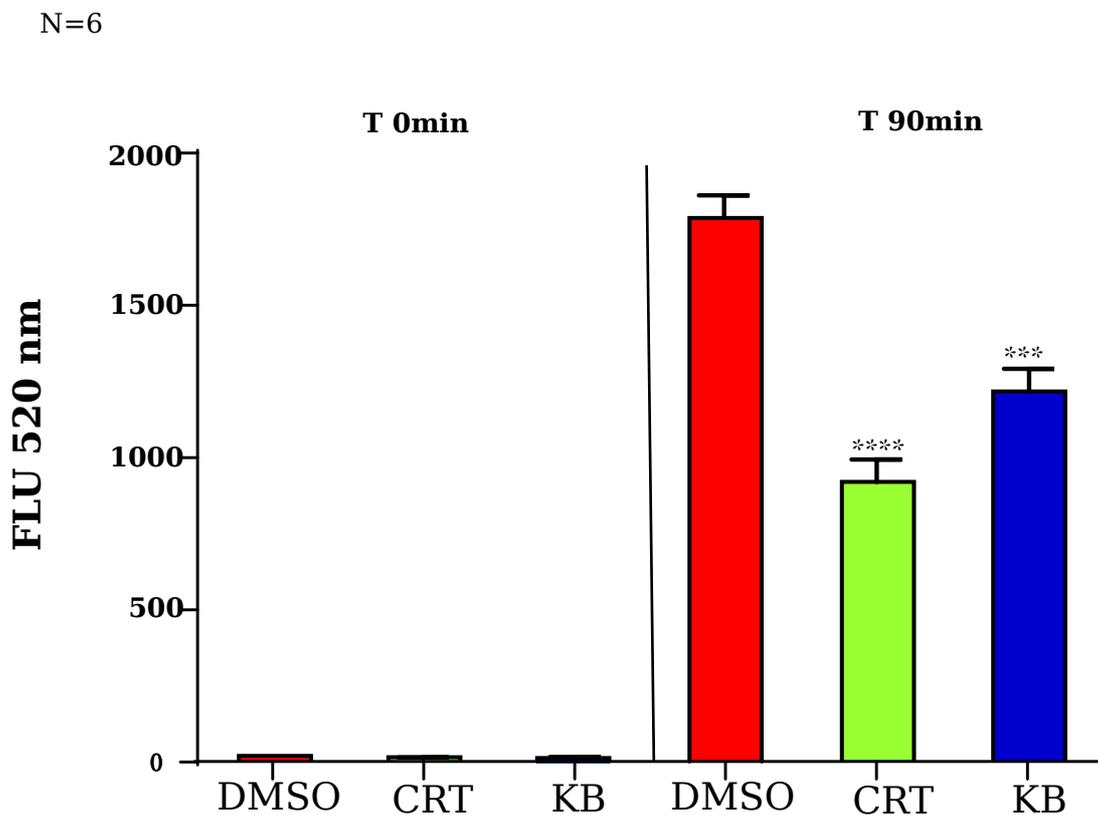


Abb. 13: Migrationsfähigkeit von Protein Kinase D-inhibierten Gewebetrauma-Patienten-PMN (Polymorphkernige Leukozyten). Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten im Ziel-Kompartiment der Messkammern. Messungen fanden jeweils nach 0 min und 90 min statt. Auf der Ordinate ist die relative Intensität der Fluoreszenz (FLU bei einer Wellenlänge von 520 nm) angegeben. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Zellgruppen: Die Kontrollgruppe (DMSO, für T 0 min und T 90 min) und die unterschiedlich Protein Kinase D-Inhibierten Gruppen (CRT und KB, differenziert) zu den beiden Zeitpunkten an. Insgesamt wurden N = 6 Ansätze mit 5×10^{-5} Einzelzellen gemessen. Es ist jeweils der Standardfehler eingezeichnet.

*Statistische Signifikanz: Varianzanalyse mithilfe des Dunett-Tests. Verglichen wurden CRT (CRT0066101) und KB (kb NB 142-70) mit DMSO (Dimethylsulfoxid) zum Zeitpunkt T = 16h. ***p-Wert < 0,001; ****p-Wert < 0,0001. (in Anlehnung an: Figure 6D, Wille et al. 2018)*

4. Diskussion

Die physikalischen Anforderungen, die an neutrophile Granulozyten, im Vergleich zu sesshaften Zellen, gestellt werden, sind enorm. Sie müssen nicht nur durch Spalten des Gefäßendothels treten, sondern auch weite Strecken im Gewebe aus eigener Kraft zurücklegen und ihre Struktur an vollkommen unterschiedliche räumliche Bedingungen anpassen. Dabei befinden sich die Bestandteile des Zytoskeletts (Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) in einem dynamischen Gleichgewicht. Die ständige Polymerisation und Depolymerisation der Filamente erfolgt in verschiedenen Bereichen der Zellen in unterschiedlichem Maße und wird durch die Zelle selber reguliert. So ist die Zelle in der Lage, ihre Form an die spezifischen Umgebungsbedingungen anzupassen. Neben der Konzentration der Polymer-Untereinheiten, sind hierfür auch zahlreiche spezielle Zytoskelett-assoziierte Proteine relevant, die das dynamische System an unterschiedlichen Stellen modulieren (Fehon et al. 2010; Mullins et al. 1998; Zigmond 2004).

Die Frage, welcher Anteil des Zytoskeletts definierend für die passive Deformierbarkeit des Zellkörpers ist, wird in der Forschung weiterhin diskutiert. Christian Rotsch und Manfred Radmacher kamen zu dem Schluss, dass diese Rolle Aktin zukommt (Rotsch u. Radmacher 2000), wohingegen Mikrotubuli keinen oder nur geringen Einfluss haben. Zu diesem Schluss gelangte auch die Arbeitsgruppe um Miento A. Tsai (Tsai et al. 1998). Die Rolle von Intermediärfilamenten, ist dagegen weniger klar. In vitro-Untersuchungen kamen zum Ergebnis, dass Vimentin den größten Anteil an der passiven Steifigkeit von Lymphozyten hat (Brown et al. 2001), und auch bei der aktiven Migration der Zellen eine wichtige Funktion ausübt (Bruehl et al. 2001). Dem widersprechen neuere Studien, die Intermediärfilamenten keinen relevanten Einfluss in vivo auf die Deformierbarkeit von Lymphozyten zusprechen (Moisan et al. 2007).

F-Aktin liegt, je nach Lokalisation, in einer Reihe von unterschiedlichen dreidimensionalen Konstruktionen vor, die unterschiedliche mechanische und visköse Eigenschaften besitzen. Jedes F-Aktin besitzt jeweils ein plus- und ein minus-Ende. Der dynamische Auf- und Abbau der Filamente findet an beiden Enden mit unterschiedlicher Bilanz statt. So ist der Anbau neuer Aktin-Untereinheiten am plus-Ende wahrscheinlicher, als am minus-Ende. Der Abbau bereits integrierter Untereinheiten ist jedoch am minus-Ende wahrscheinlicher. Dynamik und räumliche Struktur dieses Systems werden hauptsächlich von Aktin-bindenden Proteinen vermittelt. Zwei wichtige Proteine, die im Rahmen dieser Dissertation von Bedeutung sind, sind die Aktin-bindenden Proteine Cofilin und Arp2/3. Während Cofilin im Bereich des minus-Endes an F-Aktin bindet und dort zu einer beschleunigten Depolymerisation führt, ermöglicht die Bindung von Arp2/3 eine Verzweigung des Filaments in einem 70° Winkel. Somit wird überhaupt erst die Entstehung von echten Aktin-Netzwerken im Vergleich zu bloßen Faserbündeln möglich (Fehon et al. 2010; Mullins et al. 1998; Zigmond 2004).

Unsere Vermutung lautet, dass die erhöhte Flexibilität der Neutrophilen nach Gewebetrauma eine gezielte Reaktion des Organismus ist, um ihre Einwanderung ins Gewebe zu unterstützen, um dort an der Wundheilung und Abwehr von eingedrungenen Krankheitserregern teilnehmen.

Die in *Abbildung 5*, *Abbildung 9* und *Abbildung 12* dargestellten Ergebnisse unserer Untersuchung sagen aus, dass die Inhibition der PKD zu einer signifikanten Verminderung ihrer Deformierbarkeit führt. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die PKD bisher eher als Negativ-Regulator von Zellmotilität betrachtet wurde. Die erhöhte Rigidität der untersuchten Zellen zeigt, dass die Rolle der PKD in der Regulation des Zytoskeletts in beide Richtungen funktioniert. Die Ausschaltung der PKD führt erwiesenermaßen zu einer erhöhten Motilität, aber auch zu einer verringerten passiven Deformierbarkeit. Es wird deshalb vermutet, dass sowohl die Cofilin-Konzentration, als auch die Aktivität aller am Zytoskelett beteiligten Enzyme

genau ausbalanciert sein muss, um eine effiziente Zellmigration zu ermöglichen (Eiseler et al. 2009). Es hängt stark von der beobachteten Zellart und Isoform der PKD ab, ob eine Inhibition eher zu einer Zunahme oder einer Abnahme der Motilität führt (Olayioye et al. 2013).

Andererseits kommt eine Untersuchung aus dem Jahr 2014 zu dem Schluss, dass die PKD keinen besonderen Einfluss auf die Verteilung von F-Aktin oder die Phosphorylierung von Cofilin hat und spricht der PKD lediglich eine Rolle bei der Embryonalentwicklung zu (Atik et al. 2014). Um diese Widersprüche aufzuklären sind weitere Forschungen nötig, die Mehrzahl der Studien auf diesem Gebiet legt jedoch nahe, dass der PKD eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Zellpolarität und -beweglichkeit zukommt (Eiseler et al. 2007; Peterburs et al. 2009; Yin et al. 2008).

Unsere Messungen an PKD-inhibierten NB4-Zellen, Schweine-PMN und -humanen PMN zeigen, dass die Deformierbarkeit der Zellen in allen drei Gruppen signifikant vermindert wird. Bemerkenswert ist außerdem, dass auch im direkten Vergleich der PKD-inhibierten PMN vor und nach Gewebetrauma kein relevanter Unterschied in der Deformierbarkeit vorliegt. Daraus lässt sich ableiten, dass die unterschiedlichen Deformierbarkeiten bei intakter PKD auch tatsächlich in der Funktion der PKD begründet liegen.

Zieht man nun jeweils die Ergebnisse der Migrations-Assays hinzu, so wird klar, dass diese Verminderung der Deformationsfähigkeit auch starke Auswirkung auf die Migrationsfähigkeit, sprich Beweglichkeit der Immunzellen im Gewebe hat.

Es kann deshalb vermutet werden, dass eine Inhibition der PKD mit CRT und KB zu einer Blockade der traumavermittelten Erhöhung der Deformierbarkeit und einer verminderten Migrationsfähigkeit führt.

Betrachtet man die in *Abbildung 8* und *Abbildung 9* und *Abbildung 12* dargestellten Ergebnisse, so wird schnell klar, dass die untersuchten Neutrophilen 12 Stunden nach Gewebetrauma signifikant dehnbarer sind als vorher. Diese stärkere Deformierbarkeit zeigt sich auch in einer verstärkten Migrationsfähigkeit der PMN (siehe *Abbildung 10* und *Abbildung 11*).

Dies unterstützt die Annahme, dass das Gewebetrauma einen Einfluss auf die Funktion der PMN hat. Dieser Gedanke findet sich in der weit verbreiteten „Second-Hit“-Theorie der Traumatologie wieder, die besagt, dass der menschliche Körper nach einem schweren Trauma (trauma-load) auch einer erhebliche Belastung durch ärztliche Maßnahmen, wie Operationen und Transfusionen (intervention-load) ausgesetzt ist (Andersen u. Harken 1990; Narasaraju et al. 2011). Die Konsequenz dieser Denkweise ist es unter anderem, die Versorgung von nicht primär lebensbedrohenden Verletzungen zu verschieben, bis sich der Patient entsprechend erholt hat. Auf diese Weise soll eine Addition der Belastungen des Organismus verhindert werden.

Weitere Forschungsergebnisse zeigen, dass es im Rahmen von Trauma-Reaktionen zu einem sogenannten „Gen-Sturm“ kommt, bei dem eine sehr große Zahl von unterschiedlichen Genen transkribiert wird, wodurch eine unüberschaubare Zahl von adaptiven Prozessen des Organismus in Gang gesetzt wird. Dabei werden unter anderem auch große Mengen des Zytokins Interleukin-8 ausgeschüttet, das auf das Verhalten von Neutrophilen einen großen Einfluss besitzt. Diese Stress-Reaktion entwickelt sich innerhalb von 4 - 12 Stunden und dauert mehrere Wochen an (Xiao et al. 2011). Auch stark erhöhte Spiegel des Zytokins Interleukin-6 konnten in posttraumatisch gewonnenen Serumproben der Schweine nachgewiesen werden (Wille et al. 2018). IL-6 kommt eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Entzündungsprozessen und der Rekrutierung von Leukozyten zu (Romano et al. 1997). Die Auswertung der in unserer Untersuchung gemessenen Zytokinpiegel liegt zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vor und soll zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht werden.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die von uns beobachtete Veränderung der Deformierbarkeit von PMN nach Gewebetrauma als Teil eines organismusweiten „Alarmzustands“ zu verstehen ist, mit dem der Körper auf kritische Traumata reagiert.

Die Deformierbarkeit von migrierenden Zellen ist ein wichtiger Faktor für ihre Fähigkeit, sich effizient im Gewebe zu bewegen. Inaktive Neutrophile liegen zunächst kugelförmig im Blutstrom vor. Gehen sie nun in den aktiven Zustand über, passen sie ihre Form der Umgebung an. Es bildet sich eine sogenannte *leading edge* aus, eine vorgeschobene Seite des Zellkörpers, an der sich wiederum mehrere Filopodien entwickeln, mit denen der Granulozyt die Endothelschicht nach möglichen Durchtrittsstellen abtastet (Carman 2009; Nourshargh et al. 2010). Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Struktur des Aktinnetzwerks im Bereich der *leading edge* stark vom sonstigen Soma unterscheidet. Eine hohe Konzentration von Arp2/3 konnte nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass für die Migration eine hohe Interkonnektivität des Aktins nötig ist. Diese erhöhte Konzentration verschiebt sich entsprechend, wenn die Zelle ihre Polarität ändert (Weiner et al. 1999).

Um an den Wirkort zu gelangen, adhärieren die Neutrophilen und beginnen mit dem Durchtritt durch das Endothel. Hierfür erfolgt nun entweder eine parazelluläre oder eine transzelluläre Extravasation, der Granulozyt bewegt sich also entweder zwischen den Endothelzellen hindurch oder tritt direkt durch ihr Zellplasma (Engelhardt u. Wolburg 2004). Beide Wege verlangen es dem Granulozyten ab, sein Soma durch Poren im Endothel zu schleusen, die nur einen Bruchteil seiner Größe ausmachen. Hierfür ist die passive Deformierbarkeit von entscheidender Bedeutung. Deshalb kann vermutet werden, dass die von uns beobachtete Zunahme der passiven Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit nach einem Gewebetrauma gezielt vom Organismus ausgelöst wird, um es den Granulozyten zu erleichtern, ins Gewebe überzutreten. In Anbetracht ihrer kurzen Lebenszeit, ist schon eine kleine Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit relevant für die Intensität der Entzündung (Guck et al. 2010). Frühere Forschungen zeigten, dass neutrophile

Granulozyten einen wichtigen Anteil an traumainduzierten Prozessen haben. Sowohl durch die Abwehr eingedrungener Krankheitserreger, als auch die Unterstützung der Angiogenese, durch Freisetzung von VEGF, unterstützen Neutrophile die Wundheilung (Gong u. Koh 2010). Jedoch wird auch diskutiert, ob eine überschießende Aktivierung von Immunzellen das Outcome der Patienten negativ beeinflusst. Es wurde beobachtet, dass im Rahmen einer Sepsis Neutrophile eine um ca. 10% längere Überlebenszeit besitzen und größere Mengen an ROS freisetzen (Jimenez et al. 1997). Diese Beobachtung wird durch aktuelle Untersuchungen an Rhesus-Affen gestützt, die zeigen, dass ein hämorrhagischer Schock zu einer andauernden Aktivierung von Neutrophilen führt. Dabei wurden erhöhte Werte von IL-10 und IL-8 nachgewiesen, wobei die neutrophilen Granulozyten, im Vergleich zum preshock-Zustand signifikant mehr oxidatives Potential zeigten. Auch zeigten die Neutrophilen eine erhöhte Reaktion auf fMLP. Obwohl die gemessenen Zytokin-Werte der Rhesus-Affen sechs Stunden nach Schock auf normal-Niveau zurückkehrten, zeigten ihre Neutrophilen 24 Stunden nach Schock immer noch eine stark erhöhte Aktivität und ein erhöhtes oxidatives Potential (Vernon et al. 2016).

Unsere Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu bisherigen Studien, die die Deformierbarkeit von Neutrophilen untersuchten. Hier wurde mehrfach eine Abnahme der Deformierbarkeit der Leukozyten als Reaktion auf Stimuli beobachtet. Diese Studien sind jedoch nur teilweise mit unserer vergleichbar, da die Messung entweder direkt nach Stimulation der Neutrophilen durchgeführt wurde (Drost et al. 1999) oder Patienten mit fortdauernden Systemerkrankungen (Sepsis, *ARDS*) untersucht wurden (Drost et al. 1999; Skoutelis et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe um Ellen Drost und William MacNee stellte fest, dass die beobachtete Versteifung der Neutrophilen nach ca. 60 Minuten wieder abnimmt und auf das Ausgangsniveau zurückkehrt (Drost u. MacNee 2002). Somit ist es denkbar, dass sich die von uns beobachtete Zunahme der Deformierbarkeit erst im Laufe der folgenden Stunden entwickelte. Des Weiteren wurden nicht-kontaktfreie Methoden

zur Messung der Deformierbarkeit verwendet. Durch den Kontakt der Zellen zu künstlichen Oberflächen, z.B. Mikropipetten, werden Aktivierungsprozesse ausgelöst, die eine Reorganisation des Aktinfilamentnetzwerks bewirken und somit leicht zu Messfehlern führen können (Komai u. Schmid-Schönbein 2005; Yap u. Kamm 2005). Betrachtet man die erhöhte Rigidität von Neutrophilen aus dem Blut von Patienten mit septischem Schock und *ARDS*, die von den oben genannten Studien festgestellt wurden, so ist nicht auszuschließen, dass krankheitsassoziierte Prozesse und Therapien *in vivo* zu einer Überlagerung der Messergebnisse führen. Im Gegensatz dazu besteht in unserem Tiermodell die Möglichkeit, Organismen zu untersuchen, bei denen das Gewebetrauma kontrolliert ausgelöst wurde. Somit können wir eine Überlagerung durch andere Systemprozesse weitgehend ausschließen. Die weitergehenden Untersuchungen an humanen PMN zeigen den gleichen Effekt. Im Vergleich zur oben genannten Studie, waren die von uns untersuchten Patienten jedoch keinem septischen Schock und keinem *ARDS* ausgesetzt, wobei natürlich auch hier eine Beeinflussung durch krankheitsassoziierte Faktoren nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Eine mögliche Fehlerquelle unserer Untersuchung ist, dass die im Tiermodell verwendete Schweinerasse aufgrund ihrer Züchtung zu Atherosklerose neigt. Dies könnte wiederum den Ablauf der Traumareaktion verändern, zumal schon seit langem vermutet wird, dass die Entstehung der Atherosklerose mit einer Inflammationsreaktion einhergeht (Tall u. Yvan-Charvet 2015). Unsere Untersuchungen an unterschiedlichen Zellpopulationen, angefangen bei differenzierten humanen NB4-Zellen, über Schweine-PMN, hin zu humanen PMN von gesunden Spendern und Patienten, haben gezeigt, dass ein Gewebetrauma zu einer signifikanten Erhöhung der Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten führt. Diese Veränderung tritt innerhalb von 24 Stunden nach Gewebetrauma auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Enzyms PKD diesen Effekt verhindert.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der bisherigen Datenlage, so zeigt sich, dass meist eine erhöhte Rigidität der PMN durch die Traumareaktion beobachtet wurde, wobei

es dennoch im weiteren Verlauf zu einer erhöhten Migration der Neutrophilen ins Gewebe kam (Drost u. MacNee 2002). Die PKD wurde in der Forschung bisher vor allem als hemmender Faktor für die Ausbildung von F-Aktin-Netzwerken betrachtet, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass sie auch einen fördernden Einfluss besitzt (Olayioye et al. 2013).

Das hochkomplexe Zusammenspiel von PKD und anderen Regulatoren des Zytoskeletts in physiologischen und pathologischen Situationen erfordert noch ein hohes Maß an Forschung, bevor ein umfassendes Verständnis der biochemischen Abläufe möglich ist. Dennoch wird ersichtlich, dass der PKD eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Zytoskeletts von Neutrophilen zukommt.

Unsere Untersuchung bietet einen Einblick in die Mechanismen und Abläufe, mit denen die Immunzellen auf Gewebetrauma, hämorrhagischen Schock und DAMPs reagieren. Dies trägt dazu bei, mehr Verständnis für die Vorgänge während eines Traumas zu erlangen. Weitergehende Forschungen sind unbedingt nötig, um in Zukunft die Behandlung von Patienten mit Gewebetrauma adäquat an ihre Bedürfnisse anzupassen und eventuelle Folgeschäden durch das eigene Immunsystem zu vermeiden. Langfristig könnte so das Outcome vieler Patienten verbessert werden. Doch nicht nur in der Versorgung von Patienten mit Gewebetrauma ist die Verbindung von PKD und Zellmotilität von Interesse. Auch in der Krebsforschung könnte die weitere Erforschung des Themas zu mehr Verständnis für die Invasion von Karzinomzellen und letztendlich zu neuen Behandlungsansätzen führen (Alpsoy u. Gündüz 2015).

Die Proteinkinase D ist nur ein weiteres Rädchen im großen System Zelle und im noch größeren System Mensch. Schlussendlich bleibt zu sagen, dass nur ein tieferes Verständnis für die physiologischen Vorgänge in der einzelnen Zelle dazu führen kann, dass auch komplexe Krankheiten in Zukunft verstanden und behandelt werden können.

5. Zusammenfassung

Nach einem Gewebetrauma setzt der menschliche Organismus eine Kaskade von biochemischen Reaktionen in Gang, die den Körper des Patienten noch Tage und Wochen in einem Alarmzustand halten. Auch die Leukozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten, sind in diese Reaktion eingebunden. Dabei kommt ihnen einerseits eine protektive und heilungsfördernde Wirkung zu, andererseits kann eine überschießende Aktivierung der Granulozyten auch zu beträchtlichen Organschäden führen, teilweise bis hin zum Tod. Das Ausmaß, in dem diese polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) im Körper aktiv werden, bemisst sich unter anderem daran, wie effizient sie die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern können. Um durch das Endothel der Kapillaren zu wandern, müssen die PMN ihr Zytoskelett in sehr hohem Maße dynamisch reorganisieren. Diese Umformungsreaktion wird maßgeblich durch das Enzym Protein Kinase D (PKD) reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchem Ausmaß ein Gewebetrauma die Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit der PMN beeinflusst. Dazu wurden PMN von Versuchsschweinen und menschlichen Spendern, sowie Neutrophil-artige differenzierte humane Promyelozytenleukämie-Zellen (NB4) mit spezifischen PKD-Inhibitoren inkubiert und auf zweierlei Weise untersucht. Ihre passive Deformierbarkeit wurde kontaktfrei mithilfe eines Optical Stretchers gemessen, ihre aktive Migrationsfähigkeit mithilfe eines Migrations-Essays mit simulierter Endothelschicht und einem chemotaktischen Lockstoff.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Gewebetrauma im Verlauf von 12 h zu einer signifikanten Zunahme der Deformierbarkeit von Schweine-PMN führt, während ein analoger Effekt auf ein chirurgisches Gewebetrauma bei humanen PMN eintritt. Auch ihre aktive transendotheliale Migrationsfähigkeit wird in signifikantem Maße erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Reaktionen maßgeblich durch das Enzym PKD kontrolliert werden. Die Inhibition der PKD führte zu seiner Verminderung von sowohl der passiven Deformierbarkeit, als auch der

transendothelialen Migrationsfähigkeit. Dabei machte es keinen signifikanten Unterschied, ob vorher ein Gewebetrauma erfolgt war oder nicht. Dieser Effekt der PKD wurde zusätzlich an NB4-Zellen nachgewiesen.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich sehr gut nachvollziehen, dass ein Gewebetrauma zu einer stark erhöhten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt, die die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern. Dieser Zustand ist systemweit und tritt verzögert erst Stunden bis Tage nach dem akuten Ereignis auf. Es kann also abgeleitet werden, dass auch nicht betroffene Organsysteme von dieser erhöhten Entzündungsreaktion betroffen sind und somit die *trauma-load*, sprich die Gesamtbelastung des Organismus durch das Gewebetrauma, auch noch Tage später ansteigt.

Zusammenfassend belegt diese Arbeit die starke Zunahme der Deformierbarkeit und Migrationsfähigkeit von PMN im Rahmen einer Gewebetraumareaktion des Organismus und zeigt, dass dies essentiell durch die Protein Kinase D vermittelt wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Alpsoy A, Gündüz U: Protein kinase D2 silencing reduced motility of doxorubicin-resistant MCF7 cells. *Tumour Biol.* 36: 4417-4426 (2015)
2. Andersen B, Harken A: Multiple organ failure: inflammatory priming and activation sequences promote autologous tissue injury. *J Trauma.* 12: 44-49 (1990)
3. Ashkin A: Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys Rev Lett.* 24: 156-159 (1970)
4. Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T: Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature.* 769-771 (1987)
5. Atik N, Kunii M, Avriyanti E, Furumoto N, Inami K, Yoshimura S, Harada R, Harada A: The role of PKD in cell polarity, biosynthetic pathways, and organelle/F-actin distribution. *Cell Struct Funct.* 39: 61-77 (2014)
6. Boyden S: the Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes. *J Exp Med.* 115: 453-466 (1962)
7. Brown MJ, Hallam JA, Colucci-Guyon E, Shaw S: Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol.* 166: 6640-6646 (2001)
8. Bruel A, Paschke S, Jainta S, Zhang Y, Vassy J, Rigaut J, Beil M: Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induced by retinoic acid. *Anticancer Res.* 21: 3973-3980 (2001)
9. Cantürk NZ, Esen N, Vural B, Cantürk Z, Kirkali G, Oktay G, Solakoglu S: The relationship between neutrophils and incisional wound healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14: 108-116 (2001)
10. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S: Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol.* 275: H385-H392 (1998)
11. Carman C V: Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by “invadosome-like protrusions”. *J Cell Sci.* 122: 3025-3035 (2009)

12. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Andrianakis I, Betrosian A, Tsoukalas GD: Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: The role of hypoxemic resuscitation. *PLoS One*. 7 (2012)
13. Drost EM, Kassabian G, Meiselman HJ, Gelmont D, Fisher TC: Increased rigidity and priming of polymorphonuclear leukocytes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: 1696-1702 (1999)
14. Drost EM, MacNee W: Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: Effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol*. 32: 393-403 (2002)
15. Eiseler T, Döppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P: Protein Kinase D1 regulates Cofilin mediated F-actin reorganization and cell motility via Slingshot. *Cell*. 11: 545-556 (2009)
16. Eiseler T, Hausser A, De Kimpe L, Van Lint J, Pfizenmaier K: Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem*. 285: 18672-18683 (2010)
17. Eiseler T, Schmid MA, Topbas F, Pfizenmaier K, Hausser A: PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration. *FEBS Lett*. 581: 4279-4287 (2007)
18. Engelhardt B, Wolburg H: Mini review: Transendothelial migration of leukocytes: Through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*. 34: 2955-2963 (2004)
19. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A: Organizing the cell cortex: The role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11: 276-287 (2010)
20. Gong Y, Koh DR: Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res*. 339: 437-448 (2010)
21. Guck J, Ananthakrishnan R, Moon TJ, Cunningham CC, Käs J: Optical deformability of soft biological dielectrics. *Phys Rev Lett*. 84: 5451-5454 (2000)
22. Guck J, Ananthakrishnan R, Mahmood H, Moon TJ, Cunningham CC, Kä J: The Optical Stretcher: A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells. *Biophys J*. 81: 767-784 (2001)
23. Guck J, Lautenschläger F, Paschke S, Beil M: Critical review: cellular mechanobiology and amoeboid migration. *Integr Biol*. 2: 575-583 (2010)

24. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, 2, Tong Z, Deorukhkar, Sung B, Kelland L, Jamieson S, 4, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherazadeh A, Foxton C, Alexandra, Boakes, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnott-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha S: A novel small molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 9: 1136-1146 (2010)
25. Huang M, Ye Y, Chen S, Chai J, Lu J, Zhao L, Gu L, Wang Z: Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 72: 567-572 (1988)
26. Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC: Dysregulated Expression of Neutrophil Apoptosis in the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Arch Surg.* 132: 1263-1270 (1997)
27. Johannes F, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P: PKC ϵ Is a Novel, Atypical Member of the Protein Kinase C Family".(1994)
28. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE: Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma.* 60: S3-11 (2006)
29. Komai Y, Schmid-Schönbein GW: De-activation of neutrophils in suspension by fluid shear stress: A requirement for erythrocytes. *Ann Biomed Eng.* 33: 1375-1386 (2005)
30. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R: NB4, a Maturation Inducible Cell Line With t(15;17) Marker Isolated From a Human Acute Promyelocytic Leukemia (M3). *Blood.* 77: 1080-1086 (1991)
31. Laupland KB, Svenson LW, Grant V, Ball CG, Mercado M, Kirkpatrick AW: Long-term mortality outcome of victims of major trauma. *Injury.* 41: 69-72 (2010)
32. Lautenschläger F, Paschke S, Schinkinger S, Bruel A, Beil M, Guck J: The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 15696-15701 (2009)
33. Lavalle CR, Bravo-altamirano K, Giridhar K V, Chen J, Sharlow E, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ: Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. 2010: 1-16 (2010)
34. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V: Protein Kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell.* 104: 409-420 (2001)
35. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Kazumasa O, Mizuno K, Narumiya S: Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Cell Signal.* 285: 895-898 (1999)

36. Manley G, Knudson M, Morabito D, Damron S, Erickson V, Pitts L: Hypotension, hypoxia, and head injury: frequency, duration, and consequences. *Arch Surg.* 136: 1118-1123 (2001)
37. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerds V: The pig: A model for human infectious diseases. *Trends Microbiol.* 20: 50-57 (2012)
38. Moisan É, Chiasson S, Girard D: The intriguing normal acute inflammatory response in mice lacking vimentin. *Clin Exp Immunol.* 150: 158-168 (2007)
39. Mullins RD, Heuser J a, Pollard TD: The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6181-6186 (1998)
40. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, Van Rooijen N, Chow VT: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol.* 179: 199-210 (2011)
41. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M: Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 366-378 (2010)
42. Olayioye MA, Barisic S, Hausser A: Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cell Signal.* 25: 1739-1747 (2013)
43. Papazyan R, Doche M, Waldron RT, Rozengurt E, Moyer MP, Rey O: Protein kinase D isozymes activation and localization during mitosis. *Exp Cell Res.* 314: 3057-3068 (2008)
44. Paschke S, Weidner AF, Paust T, Marti O, Beil M, Ben-Chetrit E: Technical Advance: Inhibition of neutrophil chemotaxis by colchicine is modulated through viscoelastic properties of subcellular compartments. *J Leukoc Biol.* 94: 1091-1096 (2013)
45. Peterburs P, Heering J, Link G, Pfizenmaier K, Olayioye MA, Hausser A: Protein Kinase D Regulates Cell Migration by Direct Phosphorylation of the Cofilin Phosphatase Slingshot 1 Like. *Cancer Res.*: 5634-5639 (2009)
46. Pfeifer R, Tarkin IS, Rocos B, Pape HC: Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients-Has anything changed? *Injury.* 40: 907-911 (2009)
47. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, Van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A: Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 6: 315-325 (1997)

48. Rotsch C, Radmacher M: Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J.* 78: 520-535 (2000)
49. Skoutelis AT, Kaleridis V, Athanassiou GM, Kokkinis KI, Missirlis YF, Bassaris HP: Neutrophil deformability in patients with sepsis, septic shock, and adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 28: 3-7 (2000)
50. Stewart RM, Myers JG, Dent DL, Ermis P, Gray G a, Villarreal R, Blow O, Woods B, McFarland M, Garavaglia J, Root HD, Pruitt B a: Seven hundred fifty-three consecutive deaths in a level I trauma center: the argument for injury prevention. *J Trauma.* 54: 66-70; discussion 70-1 (2003)
51. Sturm, J. A.: Polytrauma. In: Karimi A, Bahr J (Hrsg) Traumatische und nichttraumatische Notfälle: Erstversorgung u. Reanimation im Rettungsdienst. De Gruyter, S. 85-93 (1988)
52. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS: Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet Pathol.* 49: 344-356 (2012)
53. Tall AR, Yvan-Charvet L: Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 15: 104-116 (2015)
54. Thim T, Hagensen MK, Drouet L, Bal Dit Sollier C, Bonneau M, Granada JF, Nielsen LB, Paaske WP, Bøtker HE FE: Familial hypercholesterolaemic downsized pig with human-like coronary atherosclerosis: a model for preclinical studies. *EuroIntervention.* 6: 261-268 (2010)
55. Tsai MA, Waugh RE, Keng PC: Passive mechanical behavior of human neutrophils: effects of colchicine and paclitaxel. *Biophys J.* 74: 3282-3291 (1998)
56. Vernon PJ, Paredes RM, Sooter AJ, Schaub LJ, Grossman HM, Pusateri AE, Glaser JJ, Sheppard FR: Severe Hemorrhagic Shock Induces Acute Activation and Expansion of IL-8+/IL-10+ Neutrophils with Enhanced Oxidative Reactivity in Non-Human Primates. *Shock.* 46: 129-136 (2016)
57. Weiner OD, Servant G, Welch MD, Mitchison TJ, John W, Bourne HR: Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nat Cell Biol.* 1: 75-81 (1999)
58. Wille C, Eiseler T, Langenberger ST, Richter J, Mizuno K, Radermacher P, Huber-Lang M, Seufferlein T, Paschke S: PKD regulates actin polymerization, neutrophil deformability and transendothelial migration in response to fMLP and trauma. *J Leukoc Biol.* 2018: 615-630 (2018)

59. Wille C, Seufferlein T, Eiseler T: Protein Kinase D family kinases: roads start to segregate. *Bioarchitecture*. 4: 111-115 (2014)
60. Xiao W, Mindrinos M, Seok J, Cuschieri J, Cuenca A, Gao H, Hayden D, Hennessy L, Moore EE, Minei JP, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Brownstein BH, Mason PH, Baker H V, Finnerty CC, Jeschke MG, López MC, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Arnoldo B, Xu W, Zhang Y, Calvano SE, McDonald-Smith GP, Schoenfeld DA, Storey JD, Cobb JP, Warren HS, Moldawer LL, Herndon DN, Lowry SF, Maier RV, Davis RW, Tompkins RG: A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 208: 2581-2590 (2011)
61. Yap B, Kamm RD: Mechanical deformation of neutrophils into narrow channels induces pseudopod projection and changes in biomechanical properties. 98: 1930-1939 (2005)
62. Yeaman C, Ayala M, Wright J, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson W, Malhotra V: Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*. 6: 106-112 (2004)
63. Yin D, Huang Y, Zhu Y, Wang Y: Both the Establishment and Maintenance of Neuronal Polarity Require the Activity of Protein Kinase D in the Golgi Apparatus. 28: 8832-8843 (2008)
64. Zigmond SH: Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16: 99-105 (2004)

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei meinem Betreuer Dr. Stephan Paschke und meiner Doktormutter Prof. Doris Henne-Bruns bedanken, durch deren Unterstützung und Anleitung diese Arbeit überhaupt erst möglich geworden ist.

Herr Dr. Paschke stand mir während meiner gesamte Zeit als Doktorand mit Rat und Hilfe zur Seite und war stets für alle Rückfragen erreichbar. Er hat mich durch den Prozess dieser Arbeit, von der Planung über die Durchführung der Experimente, bis hin zum Schreiben der vorliegenden Dissertation angeleitet und mir geholfen, die Fähigkeiten und das Verständnis zum wissenschaftlichen Arbeiten zu entwickeln.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Iris Repple, die unschätzbare Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor geleistet hat. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Dr. Tim Eiseler, Dr. Christoph Wille und Dr. Julia Richter bedanken, deren Hilfe bei der Durchführung der Experimente, vor allem für den biochemischen Anteil dieser Arbeit, von großer Bedeutung war.

Weiterer Dank gebührt Prof. Peter Radermacher und seinem Team vom Biomedizinischen Forschungszentrum, ohne deren freundliche Kooperation das Tiermodell dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke auch insbesondere meiner Familie, die mir in den oft stressigen und schwierigen Zeiten während meiner Arbeit an dieser Dissertation immer zur Seite standen.

Abschließend möchte ich meinen besonderen Dank an diejenigen aussprechen, ohne die diese Doktorarbeit absolut unmöglich gewesen wäre: All jenen Patienten, gesunden Spendern und natürlich Schweinen, deren Immunzellen die Grundlage dieser gesamten Arbeit waren.

Vielen Dank.

Lebenslauf

Sven-Thorben Langenberger
Von-Hünefeldstraße 32
89231 Neu-Ulm
Deutschland
Tel.: 0049-175-5378194

Persönliche Daten:

Name:	Sven-Thorben Langenberger
Adresse:	Von-Hünefeldstraße 32, 89231 Neu-Ulm, Bayern, Deutschland
Geburtstag:	11. Oktober 1992
Geburtsort:	Singen (Hohentwiel), Baden- Württemberg, Deutschland
Nationalität:	deutsch

Ausbildung:

2003 - 2012	Gymnasium Überlingen, Allgemeine Hochschulreife: Juni 2012
1999 - 2003	Wiestorschule Überlingen
Hochschulstudium:	
Juni 2019	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Erwerb der ärztlichen Approbation
September 2014	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab Oktober 2012	Medizinstudium an der Universität Ulm

Famulaturen:

22. Juli 2016 – 21. August 2016 Ulm	Famulatur in der Ambulanz der Allgemeinchirurgie der Universität
31. August 2015 – 4. Oktober 2015	Famulatur in der Abteilung Innere Medizin des Heliosspitals Überlingen
20. Juli 2015 – 28. August 2015	Hausarztfamulatur in Überlingen
27. Februar 2015 – 31. März 2015	Famulatur in der Abteilung Innere Medizin des Heliosspitals Überlingen
10. März 2014 – 21. März 2014	Praktikum in der Abteilung Radiologie des Heliosspitals Überlingen
18. März 2013 – 28. März 2013	Praktikum in der Abteilung Unfallchirurgie des Krankenhauses Bietigheim
11. Juni 2012 – 25. September 2012	Pflegepraktikum am Heliosspital Überlingen

Publikationen:

Wille C, Eiseler T, Langenberger ST, Richter J, Mizuno K, Radermacher P, Huber-Lang M, Seufferlein T, Paschke S: PKD regulates actin polymerization, neutrophil deformability and transendothelial migration in response to fMLP and trauma. *J Leukoc Biol.* 2018: 615-630 (2018)