

**Universitätsklinikum Ulm**

Klinik für Anästhesiologie

Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff

Sektion Experimentelle Anästhesiologie

Prof. Dr. E. Marion Schneider

**Nachweis von LC-3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) als Autophagiemarker, CD107 als Degranulationsmarker und MitoTracker als Mitochondrienmarker zur Beurteilung von Stressfaktoren bei Patienten mit Sepsis**

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

vorgelegt von

Tsioplis, Dimitrios

Kozani, Griechenland

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 12.02.2015

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1 Stressfaktoren .....	1
1.2 Sepsis .....	2
1.3 Abbauvorgänge von zelleigenem oder zellfremdem Material.....	6
1.4 Fragestellung .....	11
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Klinische Evaluation der Patienten .....	13
2.2 Material.....	14
2.3 Methoden .....	15
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Patientenkollektiv .....	32
3.2 Auswertung der Messdaten.....	33
4. Diskussion .....	69
4.1 Diskussion der angewandten Methoden und Materialien.....	70
4.2 Fragestellungen.....	71
4.3 Schlussfolgerung .....	87
5. Zusammenfassung .....	88
6. Literaturverzeichnis .....	90
Danksagung .....	94
Lebenslauf .....	95

## Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APG8B	autophagy 8B-like
Atg	Autophagy-related gene
BD	Becton Dickinson
BECN1	Beclin-1 Gen
bzw.	beziehungsweise
CA	cancer, Karzinom
CD	Cluster of Differentiation
CMXRos	Chloromethyl-X-rosamine
DNA	deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
E	Enzym
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EDTA-PB	Ethylendiamintetraessigsäure Plasmablut
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FiO <sub>2</sub>	Fraction of Inspired Oxygen
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
gr.	griechisch
GW	Granulozytenwinkel

H&L	heavy and light chain
HÄS	Hydroxyethylstärke
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
l	Liter
LAMP	lysosomal-associated membrane proteine
LC3	light chain 3
max.	maximal
MB	Markus Bader
mEq	Milliequivalent
min	Minute
min. (Schaubild)	minimal
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MT	MitoTracker
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
n	Anzahl
N3Na	Natriumazid
NETose	Neutrophil extracellular traps
NO	Stickstoffoxid
Nr.	Nummer
OP	Operation

p62	Nucleoporin 62
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAS	phagophore-assembly-site
Pat.	Patient
PatNr	Patientennummer
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PE	phycoerythrin
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	R-phytoerythrin (auch PE)
rpm	revolutions per minute
SAPS3	Simplified Acute Physiology Score
shRNA	Small hairpin Ribonucleic acid
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	side scatter
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.a.	unter anderem
ULK	UNC-51-like kinases
v.a.	vor allem
v. Chr.	vor Christus
WinMDI	Windows Multiple Document Interface
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

Die folgende Doktorarbeit untersucht Abbauvorgänge von zelleigenem oder zellfremdem Material bei intensivtherapiepflichtigen Patienten. Besondere Berücksichtigung findet hierbei der Vorgang der Autophagie - das Verdauen eigener Zellbestandteile in einem Organismus - und inwiefern dieser durch Stress beeinflusst wird. Hierfür wurden Patientengruppen mit dem gemeinsamen Stressfaktor Sepsis, sowie den unterschiedlichen Stressfaktoren, wie schwere Operationen (OP), Polytrauma, und die Präfinalphase, untersucht. Dazu wurden folgende drei Patientengruppen gebildet: 1. die Post Notfall OP-Gruppe, 2. die Post OP mit Polytrauma-Gruppe und 3. die Prae mortem-Gruppe.

## 1.1 Stressfaktoren

Verschiedene Faktoren, wie schwere Operationen, ein Polytrauma, oder der Sterbeprozess, sind Stressoren, auf die der Organismus mit starken psychischen und physischen Reaktionen reagiert. Es erfolgt u.a. eine Katecholaminausschüttung, die u.a. mit einer erhöhten Sauerstoffversorgung des Organismus den Stress zu bewältigen verhilft. Ein wichtiger Focus für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ist der nutritive Stress, der stark die Autophagie triggert [36]. Durch Autophagie werden in unserem Körper verschiedene Makromoleküle und ganze Organellen abgebaut, die funktionslos sind, oder nicht mehr benötigt werden.

### 1.1.1 Polytrauma Definition

Bei einem Polytrauma handelt es sich um eine Verletzung verschiedener Organe oder Körperregionen gleichzeitig. Von diesen Verletzungen ist entweder eine einzige, oder deren Kombination, lebensbedrohlich. I.d.R. geht mit einem Polytrauma auch eine akute Verschlechterung der Vitalparameter einher [42].

### **1.1.2 Oxidativer Stress**

Die Mitochondrien sind wichtige Organellen im menschlichen Organismus, die für die Bildung von Energieträgern verantwortlich sind. Hierfür wird der eingeatmete Sauerstoff benötigt. Bei einer erhöhten, oder einer gestörten Mitochondrienfunktion, z.B. bei einer der oben genannten Stresssituationen, kommt es zur übermäßigen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Diese Moleküle reagieren unkontrolliert mit freien Bindungspartnern, was letztendlich zu Zellschäden führt. Der Organismus ist in der Lage die physiologisch entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu eliminieren. Übermäßige Konzentrationen der reaktiven Sauerstoffspezies, oder gestörte Schutzmechanismen, führen zu erhöhtem oxidativem Stress, der u.a. Autophagie, oder Apoptose zur Folge haben kann [43].

## **1.2 Sepsis**

Eine Sepsis war bei allen Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, vorhanden. Eine schwere bestehende Infektion sorgt für einen erhöhten Stress des Organismus, der auch zu oxidativem Stress führen kann. Untersucht wurde, ob dieser zusätzliche Stress, dem die Patienten ausgesetzt waren, zu erhöhten Abbauprozessen, in diesem Fall Autophagie, führt. Des Weiteren wurde die NETose-Aktivität (Neutrophil extracellular traps) der Granulozyten untersucht. Bei der NETose handelt es sich um einen Vorgang, bei dem Granulozyten fibrilläre Matrix freisetzen, welche in der Lage ist, Mikroorganismen zu binden und dadurch deren Phagozytose zu erleichtern. Dementsprechend kommt es v.a. bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen zur NETose. [37]

### **1.2.1 Geschichte**

Der griechische Begriff Sepsis (gr. sipo) wurde bereits im 4. Jahrhundert v. Chr. erstmals von Hippokrates verwendet und bedeutet übersetzt „faul machen“. Bis zum 19. Jahrhundert wurde der Begriff auch in seiner ursprünglichen Bedeutung verwendet und die Sepsis war eine der am meisten gefürchteten Komplikationen in der Chirurgie. Diese war

hauptsächlich auf die damalige Unwissenheit über Hygienemaßnahmen zurückzuführen. Die durch Infektionen verursachte Mortalität wurde nach und nach durch Erforschung neuer antiseptischer Maßnahmen, wie z.B. dem Händewaschen (Ignaz Semmelweiss), dem Hände- und Gerätedesinfizieren (Louis Pasteur) und der Dampfsterilisation (Robert Koch) reduziert. In den folgenden Jahren des 20. Jahrhunderts wurde weiter geforscht, was schließlich zur Entdeckung pathogener Bakterien und ihrer Fähigkeit Krankheiten zu verursachen, führte. Man fand heraus, dass Bakterien, ausgehend von einem Infektionsherd, über den Blutkreislauf streuen und dadurch eine Sepsis auslösen können. Die Sterblichkeit wurde allerdings erst nach dem zweiten Weltkrieg mit Einführung der Antibiotika stark rückläufig. Auch die Verbesserung der Intensivmedizin trug zur Senkung der Sterblichkeit bei. In den 80er Jahren wurde entdeckt, dass die Sepsis nicht nur ein Entzündungsherd ist, sondern die Reaktion der eigenen Immunabwehr auf die Infektion. Schließlich erfolgte dann 1989 die noch heute gültige Definition von Roger C. Bone: "Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion." Diese Definition wurde bis heute weitergeführt [15].

### **1.2.2 Definition**

Eine Sepsis ist das Auftreten einer systemischen Entzündungsreaktion, das so genannte Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), und einer zusätzlich vorliegenden Infektion. Diese kann vermutet oder klinisch bzw. mikrobiologisch nachgewiesen werden. Ein SIRS liegt dann vor, wenn mindestens zwei der folgenden vier klinischen Kriterien zutreffen. Eine Hypothermie oder Hyperthermie (Körpertemperaturen von  $<36^{\circ}\text{C}$  oder  $>38^{\circ}\text{C}$ ), eine Tachykardie (Pulsfrequenz von  $>90$  Schläge/min), eine Tachypnoe (Atemfrequenz von  $>20/\text{min}$ ) und/oder ein arterieller  $\text{pCO}_2$  von  $<4,3\text{kPa}$  ( $33\text{mmHg}$ ) und/oder maschinelle Beatmung, eine Leukozytose  $>12.000/\mu\text{l}$  oder Leukopenie  $<4.000/\mu\text{l}$  und/oder eine Linksverschiebung  $>10\%$  im Differential-Blutbild. Liegt zusätzlich zur Sepsis noch mindestens eine der folgenden Organdysfunktionen vor, wird von einer schweren Sepsis gesprochen. Ein Kriterium ist eine akute Enzephalopathie, z.B. beim Vorliegen einer nicht durch Medikamente beeinflussten Verminderung der Vigilanz, einer Unruhe, einer Desorientiertheit und/oder einem Delir. Das zweite Kriterium ist eine Thrombozytopenie, wenn die Thrombozytenzahl unter  $100.000/\mu\text{l}$  sinkt, oder es zu einem

Thrombozytenabfall von über 30% innerhalb von 24 Stunden kommt, ohne dass ein Blutverlust vorliegt. Ein weiteres Kriterium ist eine arterielle Hypoxämie, der keine kardiale und/oder pulmonale Erkrankung zugrunde liegt die zum Abfall der respiratorischen Werte führt ( $p_{aO_2} < 10 \text{ kPa}$  (75mmHg) unter Raumluft,  $p_{aO_2}/F_{iO_2} < 33 \text{ kPa}$  (250mmHg)). Das vierte Kriterium ist die renale Dysfunktion. Diese umfasst eine Urinausscheidung, die weniger als 0,5ml/kg/Std. über mindestens eine Stunde trotz ausreichender Volumensubstitution beträgt und/oder ein Anstieg des Serum-Kreatinins der mehr als das Doppelte über dem Referenzbereich des jeweiligen Labors liegt. Das letzte Kriterium ist die metabolische Azidose, ein Basendefizit von über 5,0mEq/l oder eine Plasma-Laktat-Konzentration die mehr als das 1,5fache des oberen Referenzbereichs beträgt.

Ein septischer Schock liegt vor, wenn ein Infektionsherd nachgewiesen wurde, mindestens zwei Kriterien für ein SIRS zutreffen und entweder der systolische Blutdruck unter 90mmHg gefallen ist, bzw. der mittlere arterielle Blutdruck unter 70mmHg für mindestens 2 Stunden gesunken ist, oder der Einsatz von Vasopressoren, wie z.B. Dopamin ( $> 5 \mu\text{g/kg/min}$ ), Noradrenalin, Adrenalin, Phenylephrin oder Vasopressin erforderlich ist, um den systolischen Blutdruck über 90mmHg bzw. den mittleren arteriellen Blutdruck über 70mmHg zu halten [8, 16].

### **1.2.3 Krankheitsbild**

Eine Sepsis kann von jeder lokalen Infektion ausgehen und durch sämtliche Erreger, am häufigsten Bakterien, verursacht werden. Man spricht von einer Sepsis, wenn zusätzlich zur Infektion mindestens zwei SIRS-Kriterien erfüllt sind.

Die Symptome einer Sepsis sind hauptsächlich Folgen einer zellulären Sauerstoffminderversorgung der Organe. Dies führt zu Verwirrtheit, beschleunigter Atmung, beschleunigtem Herzschlag, hohem Fieber und erniedrigtem Blutdruck. Dies sind zwar unspezifische Zeichen, sie kommen aber bei fast allen Sepsispatienten vor.

Da die Sepsis relativ häufig auftritt und eine akute, lebensbedrohliche Situation darstellt, muss eine frühzeitige Antibiotikatherapie erfolgen. Entscheidend für den Therapieerfolg ist außerdem die Herdsanierung. Diese erfolgt oft operativ. Gute Beispiele hierfür sind die entzündete Gallenblase und der entzündeter Wurmfortsatz. Hier erfolgt i.d.R. die operative Entfernung der jeweiligen Struktur, um die Infektion zu sanieren. Die intensivmedizinische

Therapie beinhaltet auch eine künstliche Beatmung, Nierenersatztherapie, eine angemessene Schockbehandlung und eine künstliche Ernährung mit Insulingabe [34].

#### **1.2.4 Epidemiologie**

Obwohl sich im Bereich der Hygiene und Therapie sehr viel geändert hat, ist das Auftreten einer Sepsis immer noch häufig. Auch die Wahrscheinlichkeit der an einer Sepsis Erkrankten zu versterben ist hoch. In Deutschland erkranken pro Jahr 79.000 Einwohner, das entspricht einer Häufigkeit von ungefähr 116 von 100.000, an einer Sepsis zu erkranken. 75.000 Einwohner, ungefähr 110 von 100.000, erkranken an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock. Folgen dieser Erkrankung sind häufig ein irreversibles Organversagen mit tödlichem Verlauf. Pro Jahr versterben ungefähr 60.000 Menschen an dieser Erkrankung. Überlebende haben eine reduzierte Lebensqualität. Man rechnet mit einer Zunahme der Inzidenz und der Letalität. Eine wichtige Ursache ist u.a. die demographische Entwicklung. Wird eine Sepsis früh erkannt, kann die Sterblichkeit deutlich reduziert werden, indem frühzeitig mit der entsprechenden Therapie begonnen werden kann [33].

#### **1.2.5 Pathophysiologie**

Die entscheidende Rolle bei einer Sepsis spielt das Zusammenspiel der Infektion und der körpereigenen Immunantwort. Es kommt primär zu einer Ausschüttung der Mediatoren Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1). Durch sekundäre Ausschüttung weiterer Mediatoren wird die Immunantwort noch verstärkt. Zusätzlich zu dieser Hyperinflammation kommt es auch zu einer antiinflammatorischen Reaktion, u.a. durch Mediatoren wie lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-4 und IL-10. Außerdem wird auch die Apoptose, der programmierte Zelltod, aktiviert [34].

Diese Immunantwort beeinträchtigt viele Körperfunktionen. Durch die Aktivierung des Gerinnungssystems über die Expression von Tissue factor auf Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, folgt eine disseminierte intravasale Gerinnung. Die

Endothelzellen exprimieren zudem Adhäsionsmoleküle für Leukozyten, was zur Aktivierung der Leukozyten führt, die in der Folge die Endothelzellen durch die Freisetzung zytotoxischer Substanzen schädigen. Durch den folgenden capillary leak, eine erhöhte Durchlässigkeit der Kapillargefäße, kann es durch Flüssigkeitsaustritt zu intravasalem Volumenmangel kommen. In den Endothelzellen wird auch die Stickstoffoxid(NO)-Synthese stimuliert. Dies führt durch das Auslösen einer Vasodilatation zur arteriellen Hypotension. Zusätzlich kann die Sepsis Ursache einer Kardiomyopathie und wahrscheinlich auch einer Nebennierenrindeninsuffizienz mit inadäquater Vasopressin- und Insulinsekretion sein.

Dadurch kommt es häufig zu einem Multiorgandysfunktionssyndrom, welches auch die häufigste Todesursache der Sepsis ist [34].

### ***1.3 Abbauvorgänge von zelleigenem oder zellfremdem Material***

Beim Abbau von zelleigenem oder zellfremdem Material werden die Enzyme der Lysosomen benötigt. Diese werden ausgeschüttet und es kommt zu einer Degranulation. Es ist bekannt, dass Patienten, die einem erhöhten physischen Stress ausgesetzt sind, auch verstärkt gestörte und beschädigte Moleküle sowie Organellen abbauen.

#### **1.3.1. Autophagie**

Alle bisher genannten Stressfaktoren sowie der allen Patienten gemeinsame Faktor der Sepsis erwiesen sich bekannter Weise als Trigger einer gesteigerten Autophagie [10, 43].

Somit war bei Patienten, die unter einem derartigen physischen Stress standen, eine erhöhte Autophagie zu erwarten. Das Protein LC3, das im folgenden Kapitel besprochen wird, ist bekannt als typisches Protein der Autophagie. Es wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dieses Protein bei Patienten mit den oben genannten Stressfaktoren häufiger nachgewiesen werden kann als bei gesunden Probanden.

### **1.3.1.1 Geschichte**

Vor über fünfzig Jahren entdeckte und beschrieb Christian de Duve das lysosomale Zellkompartiment. Man fand heraus, dass zellfremdes Material und auch zelleigenes Material über Vesikel im Zytoplasma in den Lysosomen, die die nötigen Enzyme für den Abbau von Molekülen enthalten, transportiert und dort degradiert werden kann. Parallel zur Entdeckung der Lysosomen, wurden für diese Prozesse auch die Begriffe der Endozytose (Einschleusen und Abbau zellfremden Materials) und der Autophagie (Abbau zelleigenen Materials) eingeführt [12].

Mit den Lysosomen konnten viele Erkrankungen, wie z.B. die lysosomalen Speichererkrankungen, in Verbindung gebracht werden, weswegen es sich hierbei um eine wichtige Entdeckung für die weitere Forschung handelte. Die Autophagie, also das Autophagosom, das mit einem Lysosom fusioniert, wurde lange Zeit als wichtiger Prozess gesehen, wenn es u.a. um das Überleben von Zellen bei Hungerphasen, also bei Fehlen von Nährstoffen, ging [14]. Die Autophagie dient auch dazu beschädigte Zellbestandteile oder Organellen abzubauen und deren Bestandteile wieder zu verwenden.

Durch die Erforschung der molekularen Mechanismen der Autophagie, die man bisher meist nur morphologisch an Hefezellen erforscht hatte, konnte man v.a. durch die Forscher Daniel Klionsky und Yoshinori Ohsumi einen weitreichenden Regulationsapparat aufdecken. Man beobachtete, dass dieser Mechanismus homolog auch in vielen weiteren Spezies bis hin zu den Säugetieren aufzufinden ist [36].

### **1.3.1.2 Definition**

Die Autophagie ist ein physiologischer Prozess unseres Organismus, durch den verschiedene Makromoleküle und ganze Organellen abgebaut werden, die funktionslos sind, oder nicht mehr benötigt werden. Die Abbauprodukte können dann für die Produktion neuer Makromoleküle wieder verwendet werden.

### 1.3.1.3 Ablauf der Autophagie

Durch äußere Einflüsse, wie z.B. Nahrungsmangel oder verschiedene Krankheiten (Huang & Klionsky, 2007; Shintani & Klionsky, 2004) werden cytosolische Moleküle in Vakuolen transportiert und durch lysosomale Enzyme, wie Hydrolasen, abgebaut. Es gibt verschiedene Autophagieformen, wie die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperone-vermittelte Autophagie. Bei der Makroautophagie werden, im Gegensatz zu den anderen, die Vakuolen neu synthetisiert. Diese Doppelmembran-Vakuolen heißen dann Autophagosome. Im weiteren Verlauf verschmilzt die äußere Membran mit den Lysosomen, wodurch der Eintritt des Lysosomeninhalts gewährleistet wird. Die Bildung des Autophagosoms beginnt mit der Phagophore, die dann durch weitere Aufnahme von beladenen Vesikeln wächst und eventuell zum Autophagosom heranreift. Die Autophagie kann in drei Schritte unterteilt werden, die Keimbildung (Nukleation), die Expansion und Reifung, sowie die Kompletion. Das Autophagosom entsteht an der phagophore-assembly-site (PAS), an der auch u.a. die autophagieassoziierten Proteine (Atg) lokalisiert sind. Von den 30 bisher identifizierten Atg-Genen sind zwei, Atg12 und Atg8, ähnlich dem Ubiquitinprotein, das v.a. für den Abbau von Proteinen im Ubiquitin-System zuständig ist [20].

Das mit den Mikrotubuli an der Autophagosomenmembran assoziierte Protein LC3 (microtubule-associated protein1 light chain3), im menschlichen Genom das Homolog von Atg8, gibt es in zwei Formen [4]. Das LC3-I entsteht nach Spaltung des Atg8 durch die Protease Atg4 und besitzt ein Carboxyende. Das LC3-II entsteht durch die Verbindung des LC3-I mit dem lipophilen Phosphatidylethanolamin durch die Enzyme Atg7, Atg3 und dem Atg12-Atg5-Atg16L Multimer. Diese Enzyme entsprechen der E1-, E2-, und E3-Einheit des Ubiquitinsystems. Somit hat die Autophagie eine große Ähnlichkeit mit dem Ubiquitin-System, da die Enzyme, E1, E2 und E3, für die Ubiquitinierung der abzubauenen Moleküle verantwortlich sind. Das Phosphatidylethanolamin des LC3-II ermöglicht diesem Protein den Einbau in die ebenfalls lipophile Membran der Phagophore und des Autophagosoms. LC3-II ist für die Fusionierung mit anderen Membranen und somit für die Beladung der Phagophore und zuletzt den Abbau durch die Verschmelzung mit den Lysosomen sehr wichtig. Eine Erhöhung der LC3-II-Konzentration weist somit darauf hin, dass eine erhöhte Autophagosomenbildung oder ein gestörter Abbau, z.B. infolge fehlender Lysosomenfusion, vorliegt [6].

### 1.3.1.4 Physiologie

Die Autophagie findet im menschlichen Organismus auch unter physiologischen Bedingungen statt, um u.a. beschädigte Organellen abzubauen und deren Bestandteile wieder zu verwenden. Autophagie wird u.a. vermehrt betrieben wenn es zu Energiemangel, Nährstoffmangel - v.a. an Aminosäuren -, oder auch zu einem Mangel an Wachstumsfaktoren kommt. Somit werden durch den Abbau von überflüssigen Zellbestandteilen und Organellen Bausteine für neue Synthesevorgänge zur Verfügung gestellt. Dies geschieht, indem der Proteinkinasekomplex mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) durch diese Signale inhibiert wird und somit seine inhibierende Wirkung auf den ULK1-Kinasekomplex (Serine/threonine-protein kinase), den homologen Kinasen zu den Atg der Hefen, unterbunden wird. Somit aktiviert dann der ULK1-Kinasekomplex weitere autophagieassoziierte Proteine, die den Vorgang vorantreiben. Außerdem tragen auch weitere autophagieassoziierte Proteine zur Reifung des Autophagosoms und zur Fusion mit den Lysosomen bei.

Die Autophagie findet physiologisch andauernd statt. Eine Störung der Autophagie, die eine Inaktivität oder eine erhöhte Aktivität bewirkt, kann pathologisch oder in bestimmten Fällen auch hilfreich sein. Beispielsweise kann die gesteigerte Autophagie bei Krebserkrankungen sinnvoll sein, weil sie in frühen Stadien das weitere Wachstum von Krebszellen hemmt. In späten Stadien, kann die gesteigerte Autophagie sich allerdings nachteilig auf den Organismus auswirken. So ist beispielsweise das Tumorwachstum in schlecht vaskularisierten Bereichen des Tumors eigentlich erschwert. Durch das zur Verfügung Stellen von Nährstoffen und Energie aus unbrauchbaren Zellbestandteilen, kann aber trotz schlechter Vaskularisierung noch ausreichend Zellwachstum stattfinden [32].

Auch ist die Autophagie bei schlechtem Zustand eines Organismus ein Mechanismus zur „Rettung“ vor Apoptose und Nekrose. Das bedeutet, dass die Zelle nicht völlig eliminiert wird, wie das bei der Apoptose der Fall ist, sondern durch teilweise Wiederverwertung einzelner Organellen erhalten werden kann. Allerdings kann eine übermäßige Autophagie auch zum Zelltod führen [3, 39].

### **1.3.2 Apoptose**

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, ein physiologischer Zelluntergang. Ausgelöst wird dieser Vorgang entweder durch extrazelluläre Faktoren oder intrazellulärer DNA-Schädigung, entstanden z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies bei oxidativem Stress. Es ist ein Vorgang, der von der Zelle selbst betrieben wird und zu keinem Schaden des angrenzenden Gewebes führt.

### **1.3.3 Nekrose**

Die Nekrose ist ein pathologischer Zelluntergang. Durch äußere für den Organismus schädigende Einflüsse ausgelöst, kommt es auch zu einer Entzündung des umliegenden Gewebes. Durch das Mitwirken von Makrophagen wird das Gewebe zerstört und es bildet sich Narbengewebe.

### **1.3.4 Autophagie: Rettung vor Apoptose?**

Im Gegensatz zu Apoptose und Nekrose, wird die Zelle bei der Autophagie nicht zerstört. Einzelne Bestandteile werden abgebaut und dienen als Nährstoffe für das Überleben der Zelle.

Somit könnte die Autophagie als Retter der Zelle vor dem Untergang gesehen werden [3, 39].

Es besteht ein komplexes Zusammenspiel von Autophagie, Apoptose und Nekrose. Bei einer hypoxischen Ischämie z.B. werden sowohl die Autophagie als auch die Apoptose aktiviert. Bei Inhibition der Autophagie wurde beobachtet, dass der Zellabbau v.a. durch Nekrose erfolgt [5].

Eine Untersuchung bei Mäusen mit einer Subarachnoidalblutung zeigte, dass bei einer Inhibition der Autophagie die Apoptose induziert wurde. Eine Induktion der Autophagie zeigte eine Reduktion der Hirnschädigung [27].

## **1.4 Fragestellung**

Eine Sepsis ist ein bekannter Stressfaktor [10]. Es war bereits vor Studienbeginn bekannt, dass die Autophagie eine Folge von extra- oder intrazellulären Stressstimuli ist, wie z.B. Verletzungen von Organellen und Nährstoffmangel [14]. Oxidativer Stress, der Abbauvorgänge wie die Autophagie, die Apoptose oder auch die Nekrose auslöst, wird bewirkt durch reaktive Sauerstoffspezies, die in den Mitochondrien entstehen. Autophagie erfolgt durch die Fusion von Autophagosom und Lysosom, das durch die Degranulation - Ausschüttung der im Lysosom enthaltenen Enzyme - für den Abbau des Inhaltes des Autophagosoms zuständig ist. Das LC3-Protein ist ein wichtiger und spezifischer Baustein bei der Autophagie [4]. Somit könnte das LC3-Protein als Marker für die Autophagie dienen. Weitere wichtige Marker, die in der folgenden Arbeit eingesetzt werden, sind das CD107 als Marker für die Degranulation und der MitoTracker als Marker für die Mitochondrienanzahl. (Beschreibung der Marker siehe Kapitel: 2.3.1.1)

Unbekannt war, ob eine erhöhte Autophagie auch bei Patienten auf der Intensivstation, welche ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, aufzufinden ist. Auch der Zusammenhang des LC3-Markers mit den Markern für die Degranulation und Mitochondrienfunktion war unbekannt.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten daher in den drei Patientengruppen (1. Post Notfall OP, 2. Post OP mit Polytrauma und 3. Prae mortem) die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Ist eine erhöhte Autophagie bei Patienten in Stresssituationen im Vergleich zur Kontrollgruppe mittels LC3 nachweisbar?
2. Kann Autophagie über Nachweis von LC-3 in Blutzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgen?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen LC3 und CD107?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen LC3 und der Anzahl nachweisbarer Mitochondrien?
5. Ist die Autophagie die Rettung vor der Apoptose?
6. Werden bei Abbauprozessen Mitochondrien abgebaut, um weiteren oxidativen Stress zu vermeiden?
7. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem CD107-Marker und der Zellgröße bzw. Granularität von Granulozyten?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Klinische Evaluation der Patienten

Tab. 1: Patientengruppen und Alter der intensivpflichtigen Patienten in der Universitätsklinik Ulm.

Parameter	Alle	Post Operation gesamt n=17	Post Operation		Prae mortem n=7
			Notfall n=7	Polytrauma n=10	
Alter (in Jahren):					
Median	45	39	53	23	73
von-bis	4-85	4-85	40-85	4-52	18-85

Der experimentelle Abschnitt der vorliegenden Arbeit zur Datenerhebung erfolgte über sechs Monate. Für diesen Zeitraum war ich mit zwei weiteren Mitdoktoranden für die tägliche Evaluation von Patienten zuständig. Die Blutproben der Patienten, die die Aufnahmekriterien erfüllten, wurden ohne längere Liegedauer bearbeitet.

Jeder neue Patient wurde nach den oben genannten Sepsis-Kriterien gescreent, um festzustellen, ob er ein SIRS, eine Sepsis, schwere Sepsis oder ein septischer Schock vorlag.

Die meisten Patienten waren auf der Intensivstation wegen eines instabilen Zustands nach einer sehr großen Operation, sei diese durch einen Unfall indiziert oder geplant. Bei Notfalloperationen wurde möglichst Blut aus den Proben kurz vor der Operation verwendet.

Für die erste Gruppe, die Post Notfall OP-Gruppe, lagen von den operierten Patienten nicht immer präoperative Blutproben vor. Für diese Gruppe wurden die Blutproben vor der Operation und mindestens die zwei Tage nach der Operation erfasst.

Bei der zweiten Gruppe, die Post OP-Gruppe mit Polytrauma, wurden mehrere Blutproben und die Verläufe zweier Patienten untersucht. Alle diese Patienten wurden operativ versorgt, sodass diese auch in der Post Notfall OP-Gruppe zu finden sind.

Für die dritte Gruppe, die Prae mortem-Gruppe, wurden die Blutproben der Patienten ein bis zwei Tage vor ihrem Tod und am Todestag untersucht.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Geräte**

Pipettierhilfe: "Pipetman"	Gilson
MS1 Minishaker	IKA
Zentrifuge	Beckman GS-6R
Durchflusszytometer	BD Biosciences FACSCalibur
Mikroskop	Leica (LEICA DM IRB/E)

### **2.2.2 Materialien**

5ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	BD Biosciences
Pipettenspitzen	Greiner bio-one
FCS	Biochrom
Rabbit Serum	Dako
DPBS	Gibco - life technologies
FACS Lysing Solution	BD Biosciences
Cellfix 1:10	BD Biosciences
Perm wash	BD Biosciences
Antikörper siehe Kapitel 2.3.1.1	

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

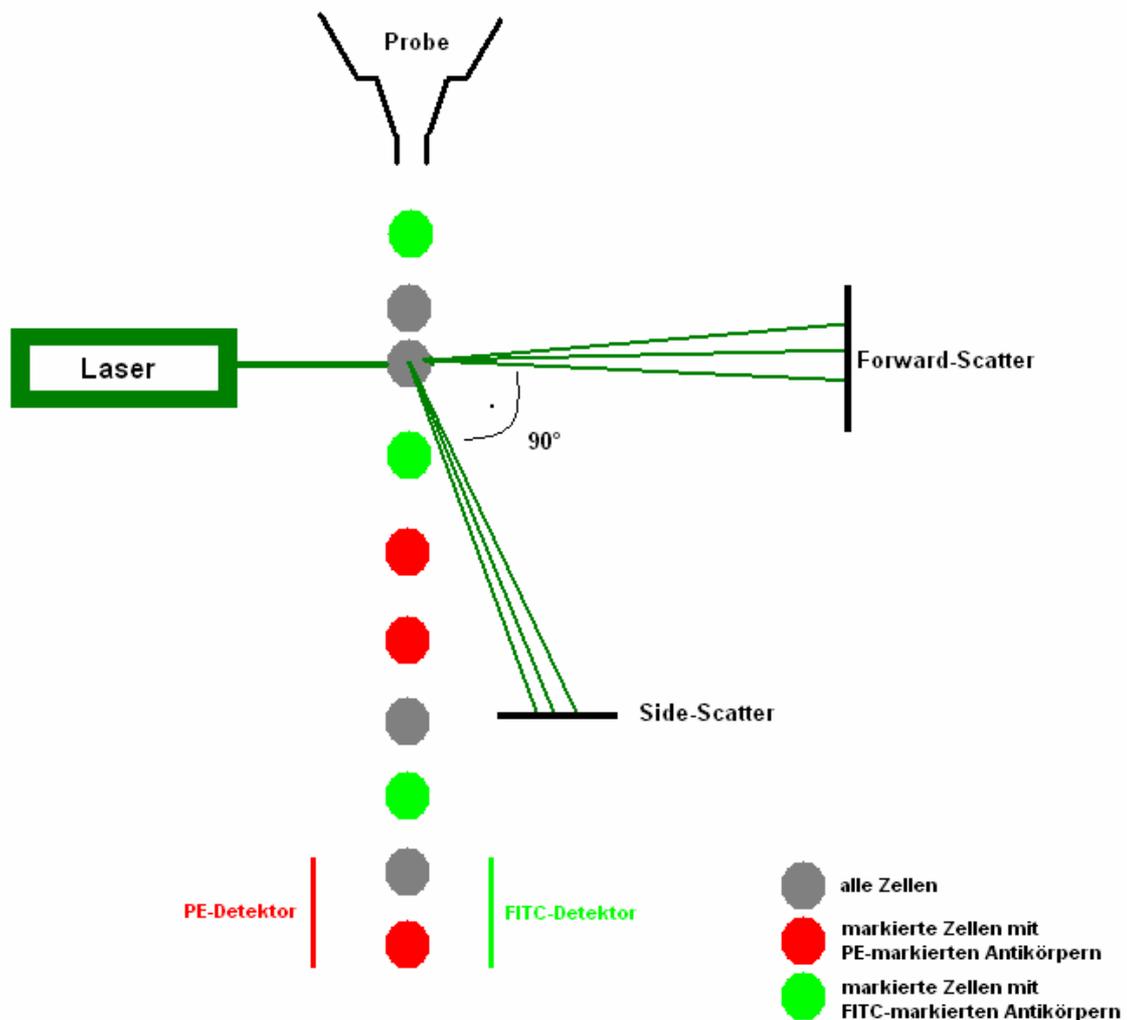


Abb.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers, oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Die Probe wird soweit verdünnt bis jede Zelle einzeln vom Laser-Strahl erfasst werden kann. Durch die Zellen herbeigeführte Streuung des Laser-Strahls wird von den Forward- und Side-Scatter detektiert. Die Zellen, die mit den grün fluoreszierenden FITC-markierten (fluorescein isothiocyanate) Antikörpern besetzt sind, werden beim Durchlaufen des FITC-Detektors detektiert. Die mit den rot fluoreszierenden PE-markierten (phycoerythrin) Antikörpern markierten Zellen, werden vom PE-Detektor detektiert.

Mit der Methode FACS, auch Durchflusszytometrie genannt, können intakte Zellen qualitativ und quantitativ vermessen werden. Der Durchflusszytometer ist ein Apparat, der üblicherweise mit einem Laser als monochromatische Lichtquelle die Zellen einzeln im 90° Winkel beleuchtet und die Lichtstreuung jeder einzelnen Zelle erfasst und abspeichert, sodass dann die Daten auf verschiedenen Parametern untersucht werden können.

Dies erfolgt folgendermaßen: Die Zellen liegen verdünnt in einer so genannten Hüllflüssigkeit vor, die z.B. eine Pufferlösung, oder Kochsalzlösung sein kann und zum Transport jeder einzelnen Zelle durch den Laserstrahl dient. Somit kann die Lichtstreuung jeder einzelnen Zelle auf zwei Detektoren, den forward scatter (FSC) für die nur leicht gestreute Vorwärtslichtstreuung und den side scatter (SSC) für die 90° vom Lichtstrahl zur Seite gestreuten Seitwärtslichtstreuung, erfasst werden. Außerdem können mit Fluoreszenzstoffen bearbeitete Zellen detektiert werden. Dies sind Antikörper, die dann umso heller leuchten, je mehr Antikörper-Moleküle an den Zellen gebunden haben. Mit dieser Methode kann auch der DNA-Gehalt oder die biochemische Eigenschaften von Zellen untersucht werden. Diese erfassten Lichtsignale werden von den so genannten Photomultipliern in elektrische Signale umgewandelt, die dann abgespeichert werden.

Die Auswertung kann dann u.a. z.B. in Form von Scatter plot Diagrammen oder Histogrammen erfolgen. In einem Scatter plot werden in einem Zweidimensionalen Diagramm die Zellgröße, entspricht der Vorwärtslichtstreuung, und die Granulation, entspricht der Seitwärtslichtstreuung durch die einzelnen Vakuolen und Granula dargestellt. Auf der X-Achse ist die Größe und auf der Y-Achse die Granulation der Zellen dargestellt. Die einzelnen Zellen werden in Form von Punkten, wobei jeder Punkt eine Zelle entspricht, im Diagramm abgebildet. In einem Histogramm wird die Häufigkeit der Zellen, die einem bestimmten Messwert entsprechen, in einem eindimensionalen Schaubild dargestellt [38].

### **2.3.1.1 Fluoreszenzmarker**

Mit der Durchflusszytometrie kann man wie schon beschrieben auf verschiedene Diagramme die Größe und Granularität von Zellen zeigen. Das wäre ein Scatter plot, ein Diagramm, das die Streuung der Zellen als Punkte in zwei Ebenen zeigt. Dazu kann man auch durch andere fluoreszierende Marker weitere Merkmale von Zellen nachweisen. Die

Marker sind Antikörper, die an bestimmten Bausteinen der Zellen binden. Diese können sich frei intrazellulär befinden, oder auch in der Zellmembran eingebaut sein. Die Marker können entweder direkt, also ohne eine weitere Komponente, im Laserlicht leuchten, oder es sind indirekte Fluoreszenzantikörper, die noch einen fluoreszierenden Antikörper benötigen, der auf diesen bindet und leuchtet.

Mit Hilfe eines Scatter plot Diagramms ohne beigefügte Marker wird durch Größe und Granulation der Zellen die Zellart bestimmt. Diese Gruppen von Zellen können zur besseren Darstellung und zur späteren Identifikation dieser Zellen in Schaubildern nachfolgender Untersuchungen im Programm farblich gekennzeichnet werden. Somit kann veranschaulicht werden, welche Zellen mit den beigefügten Markern markiert wurden.

Einer unserer Marker ist der LC3-Antikörper (APG8B) der Firma Abgent. Dieser Antikörper wird von, mit dem C-Terminus der menschlichen LC3 immunisierten, Kaninchen gewonnen. Er kann sowohl für Western Blot Untersuchungen, als auch wie in unserem Fall für das Durchflusszytometrie-Verfahren genutzt werden [2].

Der Marker, der von uns für die Messungen verwendet wurde, misst sowohl LC3-I, als auch LC3-II. Die weitere Identifizierung ist mit dem Western Blot-Verfahren möglich. Diese Untersuchung wurde von uns nicht durchgeführt. Damit dieser Marker auch fluoresziert, muss noch ein Antikörper gegen das Kaninchen-Antigen, der Anti-Rabbit IgG-H&L-Antikörper (ab6717) der Firma Abcam, hinzugefügt werden, der mit dem fluorescein isothiocyanate (FITC) Farbstoff grün fluoresziert [1].

Zu beachten ist immer, dass die Marker, der für die Fluoreszenz dient, auch zu einem geringen Anteil unspezifisch binden können. Somit wird auch die alleinige Gabe von diesem Marker untersucht, um die unspezifische Bindung, also die Bindung auf andere Zellen, die keinen Kaninchen-Antikörper haben, zu subtrahieren. .

Ein anderer Antikörper ist der Anti-Human CD107a FITC der Firma Diaclone. Er bindet das lysosomal-associated membrane proteine 1 (LAMP 1) bzw. CD107 (cluster of differentiation) das für die Identifikation von Oberflächenmolekülen auf Leukozyten dient [17]. Somit wird die Degranulation der Lysosomen nachgewiesen, indem das LAMP 1, das nach Exozytose der Lysosomen kurz u.a. auf zytotoxische Zellen exprimiert wird, von dem Marker gebunden wird [13].

Der letzte Marker ist der MitoTracker Red CMXRos der Firma invitrogen. Dies ist ein in roter Farbe fluoreszierender Marker, der an Mitochondrien bindet und leuchtet [25].

Außerdem verwendeten wir noch den humanen CD14-Antikörper R-Phycoerythrin (RPE, auch PE), der eine rote Färbung ergab, der Firma Beckman Coulter und Produktlinie

IOTest [7].

Diesen Marker haben wir für die genauere Differenzierung der Monozyten und Makrophagen, auf denen dieses Oberflächenmolekül hauptsächlich exprimiert wird, benutzt.

### **2.3.1.2 Vorbereitung der Proben: Entwicklung des Protokolls**

Ziel unserer Untersuchung war es den Vorgang Autophagie nachzuweisen. Dazu wurde Vollblut, das jeden Morgen gegen 7 Uhr in einem EDTA-Röhrchen, das Ethylendiamintetraessigsäure enthält und das Blut für die weiteren Untersuchungen vom Gerinnen abhält, den Patienten entnommen. Unsere Patienten waren aus der anästhesiologischen Intensivstation am Safranberg. Es wurden von uns die Patienten ausgesucht, die einen der drei Stressfaktoren – Post OP, Post OP mit Polytrauma, oder prae mortem – hatten. Zusätzlich hatten alle Patienten dazu noch eine Sepsis oder eine schwere Sepsis.

Die Autophagie findet in allen Zellen, die einen Zellkern enthalten, statt. Somit wurde unser Fokus im Vollblut auf die Leukozyten gesetzt. Hauptsächlich in den Granulozyten war die Autophagie sehr gut unter ein inverses Mikroskop anhand eines Blutausstriches zu beobachten.

Zusätzlich zum Autophagiemarker LC3 wurden auch der CD107 und der MitoTracker eingeführt, der CD107-Marker als Marker der Degranulation der Lysosomen und der MitoTracker als Marker der Mitochondrienanzahl.

Da man sich in unserem Fall nun auf die Leukozyten konzentriert hatte, musste der größte Anteil des Vollblutes, die Erythrozyten, rausgesiebt werden, bevor dann die restlichen Zellen mit den Antikörpern markiert werden konnten. Die Untersuchung mit dem FACS wäre unter Verwendung von Vollblut bei einer gemessenen Zellzahl von 10000 Zellen zu ungenau gewesen, da der größte Teil des Vollbluts aus Erythrozyten besteht.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte unseres Protokolls aufgeführt, dessen Erstellung ungefähr zwei Monate Zeit beansprucht hat und noch ca. einen Monat bis zur Optimierung und Einführung der Marker LC3 und MitoTracker.

Wie erwähnt wurde das Blut immer zum gleichen Zeitpunkt entnommen. Im Labor wurde dann das EDTA-Röhrchen im Kühlschrank bei ca. 4°C für uns aufbewahrt. Täglich wurden

dann die Blutproben der Patienten, die wir für unsere Untersuchungen benötigten, sortiert und bearbeitet. Dafür musste auch für eine weiterhin konstante Temperatur von 4°C geachtet werden. Um dies zu erreichen musste das Eis, in dem die Proben zum Bearbeiten gehalten wurden, vor dem Schmelzen gewechselt werden, da es in flüssiger Form zu einer Temperatursenkung auf ca. 0°C kommen würde, was zum Einfrieren der Probe führen könnte.

Das Blut besteht aus dem Plasma und den zellhaltigen Bestandteilen. Für unsere Messungen wurden nur die Leukozyten benötigt, die Zellen, die für die spezifische und unspezifische Immunantwort zuständig sind und im Körper eingedrungenes Fremdmaterial bekämpfen. Dies wurde durch die folgenden Schritte der Probenaufbereitung erreicht:

Im ersten Schritt musste dafür gesorgt werden, dass die Proben von Erythrozyten befreit werden. Dies passiert, nachdem in vier FACS-Röhrchen jeweils 70µl Vollblut pipettiert wurde und 2ml vom Lysepuffer, ein BD Facs Lysing Solution – Wasser – Gemisch von 1:10, zugegeben wurde. Nachdem das zunächst trübe Flüssigkeitsgemisch klar geworden ist, dies hat ca. sieben bis zehn Minuten in Anspruch genommen, mussten die Proben nun in der Zentrifuge GS-6R der Firma Beckman zentrifugiert und der nicht benötigte Überstand abgegossen werden. Darauf wurden die Proben mit einem Waschpuffer (2ml aus einem Gemisch von 500ml Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS), 0,5g Natriumazid (N3Na), 2,5ml Invitrogen fetal calf serum (FCS)) „gewaschen“. In diesem Vorgang wurde das Pallet (Belag auf dem Röhrchenboden) durch Schütteln resuspendiert und mit erneuter Zugabe von Waschpuffer zentrifugiert. Die Puffer-Lösung sorgt für ein physiologisches Milieu, damit die Zellen nicht zerstört werden, das Natriumazid für eine Keimfreie Probe und das Kälberserum als Nährstoffquelle für die Zellen. Das vierte Röhrchen (Nummerierung: siehe Protokoll Abb.2 am Ende dieses Kapitels) wurde für ein normales Scatter plot benötigt, sodass diese Probe nur einmal gewaschen werden musste. Die anderen drei Röhrchen wurden mit 100µl von einem BD Perm/Wash–Wasser–Gemisch von 1:10 versetzt. Dieser Schritt sorgt für ein Permeabilisieren der Zellmembranen, welche das Passieren der im Weiteren verwendeten Antikörper durch die Membran in die Zelle ermöglicht. Dieser Schritt nahm 10 Minuten in Anspruch. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 2ml Waschpuffer folgte nun das Versehen der Proben mit den Antikörpern. Die Inkubation der Antikörper dauerte eine halbe Stunde. Wichtig war es, die Proben mithilfe von Aluminiumfolie vor Licht zu schützen, da die Antikörper lichtempfindlich sind. Die vorbereitete Blutprobe im ersten Röhrchen wurde im ersten Schritt mit 3µl vom CD14 RPE und nach der Inkubation und einem Waschvorgang im

zweiten Schritt mit 8µl vom Rabbit IgG H&L FITC versehen. Das zweite Röhrchen beinhaltete 3µl CD14 RPE und 8µl LC3-Antikörper APG8B im ersten Schritt und Rabbit IgG H&L FITC im zweiten Schritt. Das dritte Röhrchen wurde im ersten Schritt mit 8µl CD107a FITC versehen und vor der Fixierung mit 5µl MitoTracker. Das vierte Röhrchen beinhaltete keine Antikörper. Eine Übersicht der Zusammensetzung ist im Protokoll (Abb.2) zu sehen und die genaue Beschreibung der Antikörper im vorherigen Kapitel. Schließlich wurden alle Proben mit 50µl von dem BD Cell Fix fixiert, sodass diese für ca. eine Woche bei luftdichter, vor Licht geschützter Lagerung in 4°C bis zur Messung konserviert werden konnten. Um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden und somit vergleichbare Werte zu haben, wurden die Proben in den ein bis zwei Folgetagen nach Fixierung gemessen.

Die genauen Mengen an Marker, die von uns benutzt wurden, wurden ermittelt, indem man sich streng nach den Schaubildern, den Scatter plots, orientierte. Dafür mussten viele Testproben von derselben Blutprobe untersucht werden, bis die Ergebnisse präzise waren. Zu geringe Markermengen haben nicht ausgereicht, um vollständig an ihren Bindungspartner zu binden und zu hohe Mengen führten zu vermehrt unspezifische Bindungen und zu Verklumpungen. Auch für das Waschen der Proben wurden viele Versuche benötigt, um das optimale Ergebnis mit dem richtigen Puffer, bei den richtigen Zentrifugeneinstellungen, von 850 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten, zu erreichen. Somit konnten dann auch die Auswertungen viel präziser erfolgen.

## Perforin – Apoptose und Autophagiemessung

Datum:

PatNR:

Name:

Einsender + Grund:

Material: 70 µl EDTA-PB / Tube

Typisiert am:

Gemessen am:

4 Röhrcchen beschriften; 70 µl Blut pipettieren;

+ 2,0 ml Lysepuffer auf alle Röhrcchen (7 – 10 min, bis Lösung klar);  
abzentrifugieren (5min bei 830rpm); Überstand abgießen; resuspendieren;  
**(nicht rätschen!);**

1x mit Waschpuffer (1 Flasche PBS + 2,5ml FCS + 0,5g NaN<sub>3</sub>) (2,0 ml auf alle Röhrcchen)  
waschen; abzentrifugieren (5min bei 830rpm); Überstand abgießen; resuspendieren  
**(nicht rätschen!);**

+ **100 µl PERM** auf alle Röhrcchen (10 min);

1x mit Waschpuffer (1 Flasche PBS + 2,5ml FCS + 0,5g NaN<sub>3</sub>) (2,0 ml auf alle Röhrcchen)  
waschen; abzentrifugieren (5min bei 830rpm); Überstand abgießen; resuspendieren  
**(nicht rätschen!);**

### + Antikörper

101) **3µl CD14 RPE** (IOTest – Art.-Nr.: A07764 - Isotyp:IgG2a)

102) **3µl CD14 RPE** (IOTest – Art.-Nr.: A07764 - Isotyp:IgG2a) / **8 µl LC3-Anantikörper**  
**APG8B** (Abgent Nr.: AP1802b) 1:10 Verdünnung

103) **8µl CD107a FITC** (Diacclone Art.-Nr.: 852901010 – IgG1)

104) Einfacher Scatterplot (keine Antikörper)

30 min inkubieren lassen;

1x mit Waschpuffer (1 Flasche PBS + 2,5ml FCS + 0,5g NaN<sub>3</sub>) (2,0 ml auf alle Röhrcchen)  
waschen; abzentrifugieren (5min bei 1000rpm); Überstand abgießen; resuspendieren  
**(nicht rätschen! / nicht 104);**

### + Antikörper (8 µl)

101) **Rabbit IgG H&L FITC** (Abcam – ab6717) 1:200 Verdünnung

102) **Rabbit IgG H&L FITC** (Abcam – ab6717) 1:200 Verdünnung

103) -

104) -

30 min inkubieren lassen;

1x mit Waschpuffer (1 Flasche PBS + 2,5ml FCS + 0,5g NaN<sub>3</sub>) (2,0 ml auf alle Röhrcchen)  
waschen; abzentrifugieren (5min bei 1000rpm); Überstand abgießen; resuspendieren  
**(nicht rätschen! / nicht 104);**

101) -

102) -

103) **5 µl Mitotracker** Red CMXRos – Molecular Probes – Invitrogen

104) -

fixieren mit 50µl Cellfix

-> messen am FACS

Abb.2 Protokoll: Vorbereitung der Blutproben für die FACS-Analyse PatNR: Patientennummer; EDTA-PB Ethylendiamintetraessigsäure Plasmablut; Perm: BD Perm/Wash; rpm: revolutions per minute; PBS: Phosphate Buffered Saline; N3Na: Natriumazid; FCS: fetal calf serum; FACS: Fluorescence activated cell sorting; RPE: R-phycoerythrin; FITC: fluorescein isothiocyanate, µl: Mikroliter, ml: Milliliter, min: Minuten, CD: Cluster of Differentiation, IgG: Immunglobulin G, Art.Nr. Artikelnummer.

### **2.3.1.3 Auswertung der Messdaten**

Zum Auswerten der Dateien des Durchflusszytometers, des FACS, benötigt man ein Programm, das diesen Dateityp, in dem die Messungen abgespeichert werden, auslesen kann. Von uns wurde zu Beginn das Programm CellQuest Version 3.3 von BD Biosciences im Labor, das direkt mit dem FACS verbunden war und auch für das Durchführen der Messungen diente, verwendet. Um weitere Nachuntersuchungen durchführen zu können, wurde auf das Programm WinMDI Version 2.9 gewechselt, das sich für die Auswertungen als genau so gut erwiesen hatte.

Im Ersten Schritt wurden von jeder Probe zunächst ein Scatter plot ohne und eins mit den Fluoreszenzmarkern angefertigt. Das schönste und nicht durch die Marker beeinflusste Scatter plot wurde mit der vierten Probe erzielt, die allein dafür vorbereitet wurde und somit keine Marker oder permeabilisierende Lösungen enthielt. Die Probe enthielt nur die von uns benötigten Leukozyten, da die Erythrozyten zuvor lysiert und ausgewaschen wurden. Aus diesen Diagrammen konnte man dann folgende Messdaten ablesen.

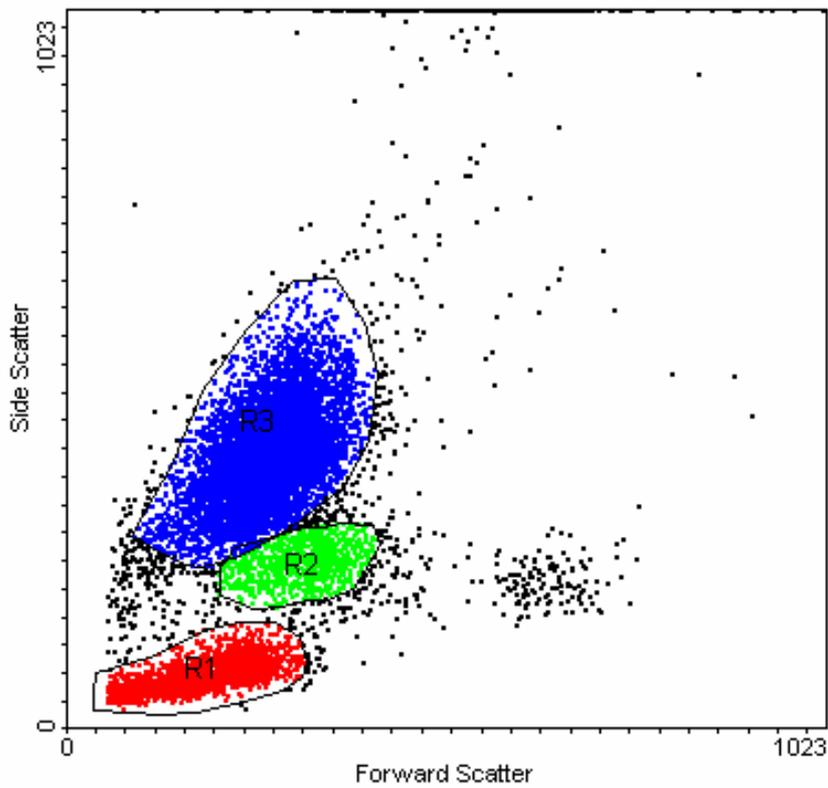


Abb. 3 Scatter plot. In einem Scatter plot Schaubild einer FACS-Analyse sind die gemessenen Zellen an den einzelnen Punkten zu erkennen. Der Forward Scatter (FSC-Height) auf der X-Achse gibt das Volumen der einzelnen Zellen an. Der Side Scatter (SSC-Height) auf der Y-Achse gibt die Granulation an. Anhand der Größe und Granulation der Zellen kann auf die Art der Zellen geschlossen werden. Rot markiert sind die Lymphozyten (R1), grün markiert die Monozyten (R2) und blau die Granulozyten (R3). FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting.

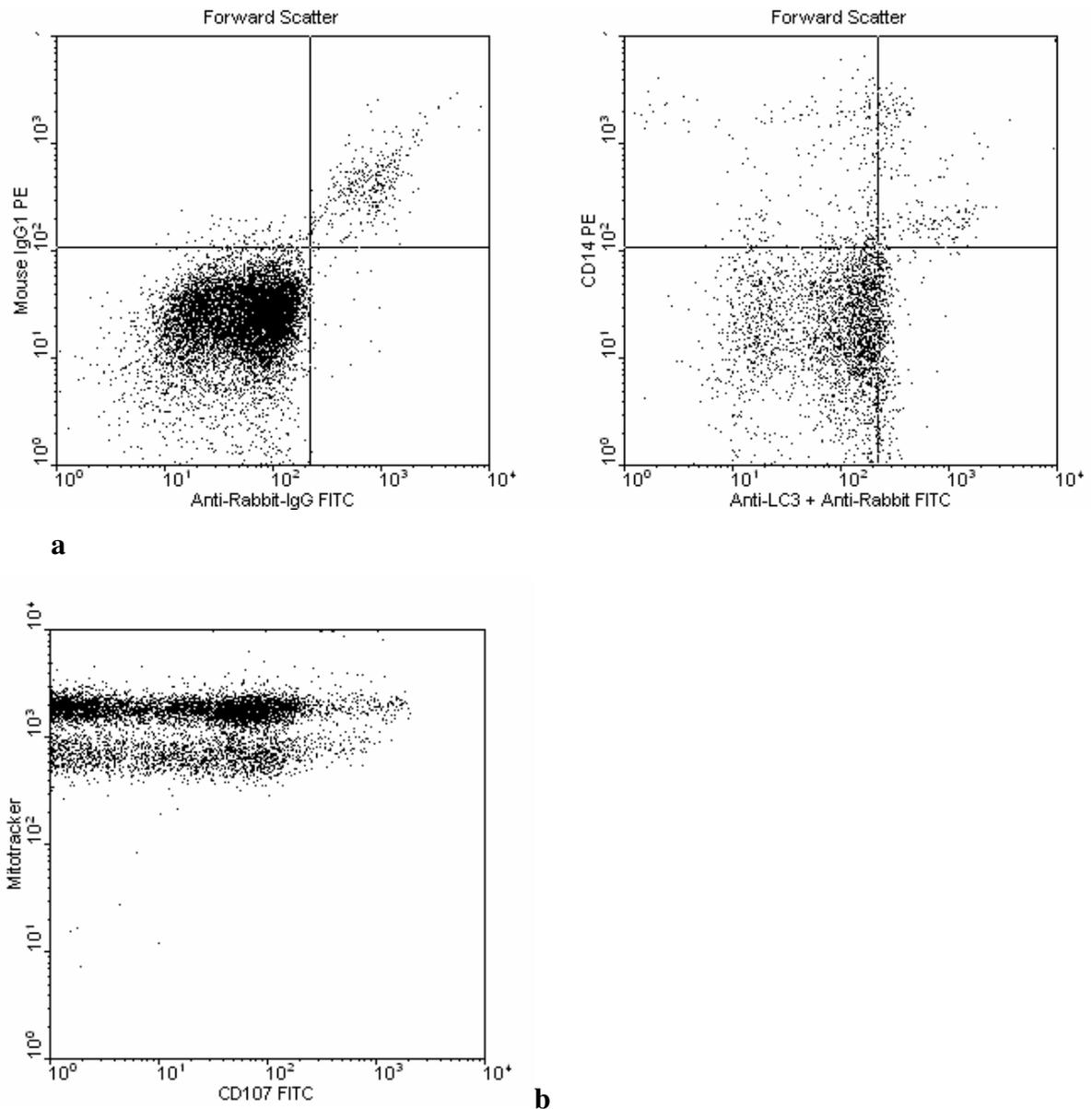


Abb. 4 In der Abb. 4a wird gezeigt, wie der LC3-Wert der Patienten abgelesen wurde. Im linken Bild ist das Schaubild der Probe mit dem Anti-Rabbit-IgG-Marker, der auch unspezifisch, also an anderen Antigenen als das Kaninchen-IgG binden kann. Im rechten Bild ist die Probe dargestellt mit dem Anti-Rabbit-IgG-Marker und dem nicht fluoreszierenden Anti-LC3-Marker, auf dem der fluoreszierende Anti-Rabbit-IgG-Marker bindet. Hier kann gemessen werden, um wie viele Einheiten sich der Mittelwert auf der X-Achse, die die grüne FITC-Färbung des Anti-Rabbit-IgG-Markers zeigt, im Vergleich zur linken Probe mit dem unspezifisch gebundenen Anti-Rabbit-IgG-Marker verschoben hat. Diese Verschiebung wird bewirkt durch das zusätzliche Binden des fluoreszierenden Anti-Rabbit-IgG-Markers am in der rechten Probe enthaltenen LC3-Marker. In der Abbildung 4b ist das Schaubild der Probe mit dem grünfluoreszierenden CD107-Marker auf der X-Achse und dem rotfluoreszierenden MitoTracker-Marker auf der Y-Achse dargestellt. Hier wurden jeweils die Mittelwerte der Achsen gemessen, die die Menge an gebundenem Marker angeben. LC3: light chain 3, IgG: Immunglobulin G, FITC: fluorescein isothiocyanate: CD: Cluster of Differentiation,

Am Scatter plot wurde zum einen den Side-Scatter an der Y-Achse abgelesen und somit die Granularität der, in der Probe enthalten, Zellen bestimmt. Die Werte waren die Mittelwerte, in diesem Fall der Y-Mean. Der X-Mean, also der Mittelwert des Forward-Scatters, diente zu Messung der Zellgröße. Schließlich konnte noch mit einem Winkelmesser, den MB-Ruler - the triangular screen ruler 5.0 -, der Winkel der „Granulozytenwolke“ gemessen werden. Dieser ist wichtig, da er etwas über den Zustand der Zellen aussagt. Ein hoher Winkelgrad deutete auf überwiegend apoptotische Zellen hin und ein niedriger Winkel auf den Vorgang der NETose und/oder Nekrose.

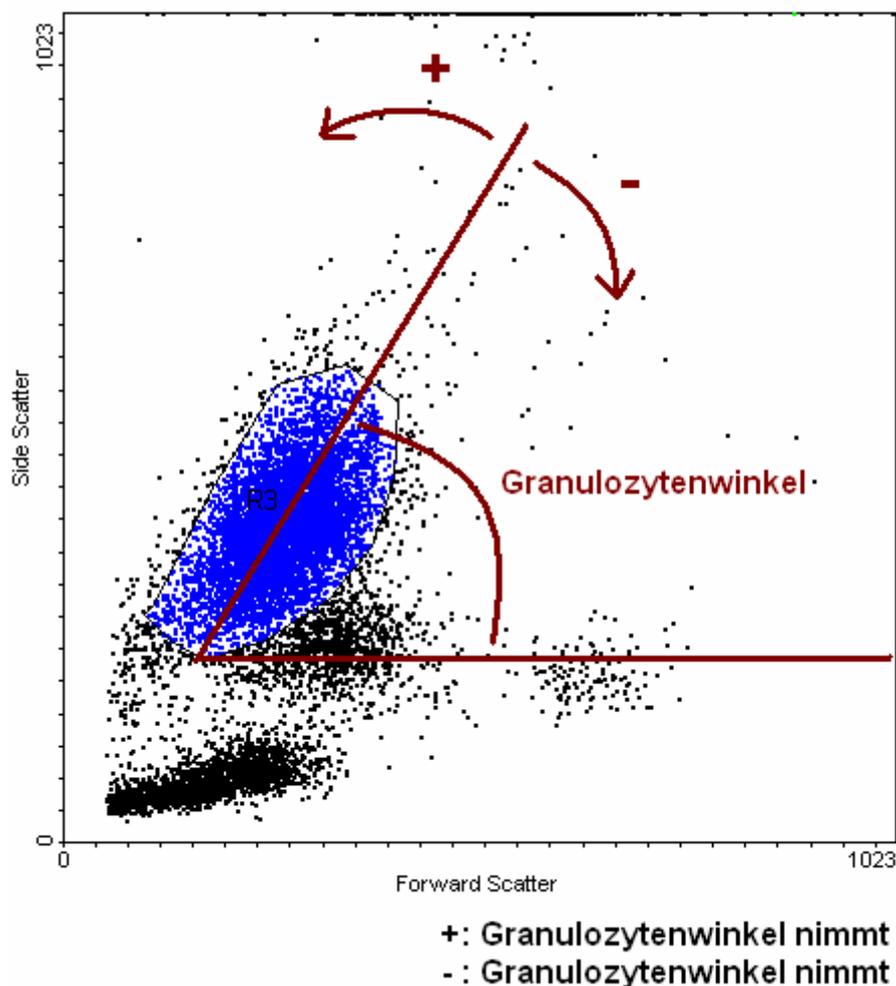


Abb. 5 Messen des Granulozytenwinkels. Blau markiert sind die Granulozyten. Sind die Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe verkleinert und granulierter, zeigt die „Granulozytenwolke“ einen höheren Y-Wert und niedrigeren X-Wert, wodurch sich ein größerer Winkel ergibt. Sind die Granulozyten im Gegensatz dazu vergrößert und weniger granuliert, wird ein kleinerer Winkel gebildet.

Für das Auswerten der weiteren Daten, die mit den LC3-, der CD107- und der MitoTracker-Marker erhoben wurden, benötigte man die Diagramme, die mit den Messungen der Fluoreszenzmarker berechnet wurden. Für den indirekt fluoreszierenden grünen FITC LC3-Marker benötigte man zwei Proben. Im ersten Schritt musste die Probe gemessen werden, die erst mit dem LC3-Antikörper und dann mit dem fluoreszierenden Antikörper gegen das Kaninchen-IgG, aus dem der LC3-Antikörper gewonnen wurde, bearbeitet wurde. Dafür wurde vom Programm der Mittelwert auf der X-Achse berechnet. Im zweiten Schritt musste aus der zweiten Probe, die nur mit dem fluoreszierenden Kaninchen-IgG markiert wurde, der Wert berechnet werden und von der ersten Probe abgezogen werden. Somit hat man den Wert unspezifisch gebundenem Kaninchen-IgG's vom Wert, mit dem man die weiteren Auswertungen und Analysen fortführte, eliminiert. In einer dritten Probe wurden die Zellen mit den Markern CD107 und MitoTracker markiert. Somit konnte man sich dann vom Programm die zwei Mittelwerte berechnen lassen. In dieser Probe war dies möglich, da der CD107-Marker ein grün fluoreszierender FITC-Marker war, dessen Fluoreszenz auf der X-Achse gezeigt wurde, und der MitoTracker ein rot fluoreszierender PE-Marker war, dessen Fluoreszenz auf der Y-Achse abzulesen war.

### **2.3.1.4 Darstellung der Ergebnisse**

Im Kapitel 3 werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt.

In den Schaubildern werden die Werte der jeweiligen Marker auf die Messzeitpunkte in den verschiedenen Tagen dargestellt. Messwerte vor der Operation der operierten Patienten werden nicht aufgeführt, da diese bei einer äußerst geringen Anzahl an Patienten erhoben werden konnte. Die Einheit der Marker auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen markierten Zellen. Somit lässt sich ein Verlauf der Werte zeigen.

In Form von Tabellen werden Häufigkeiten von den gemessenen Markern dargestellt. In tabellarischer Form werden auch Zusammenhänge verschiedenerer Marker untereinander gezeigt.

### **2.3.1.5 Analyse der Daten**

Aus den durchgeführten Messungen wurden die Daten ausgewertet und im Weiteren analysiert. Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Messwerte miteinander verglichen und deren Bedeutung erläutert. Die folgenden Tabellen sollen zunächst eine Übersicht der zu beobachtenden Vorgänge bei den Patienten geben (Tab.2). Eine Übersicht der gemessenen Marker und deren Bedeutung gibt die zweite Tabelle (Tab.3) an und die dritte den Zusammenhang der Marker untereinander (Tab.4).

Tab. 2: Begriffsdefinition verschiedener Vorgänge in humanen Zellen.

<b><u>Vorgang:</u></b>	<b><u>Definition:</u></b>
Autophagie	Recycling der Zelle. Es können einzelne Makromoleküle, oder Organellen abgebaut werden, um somit wieder Bausteine für die Wiederverwertung bereitzustellen. Dies geschieht u.a. bei schlechten Lebensbedingungen, wie Nährstoffmangel, um wieder für günstige Bedingungen der Zelle zu sorgen. Dies kann das Absterben der Zelle verhindern, aber bei einem übermäßigen Niveau auch zum Absterben der Zelle führen.
Apoptose	Die Apoptose ist ein Abbauvorgang, der von der Zelle selbst betrieben wird. Er kann durch externe, oder Zellinterne Signale aktiviert werden. Dies hat immer einen programmierten Zelltod zur Folge. Die Zellen nehmen bei diesem Vorgang an Volumen ab, da Inhalt der Zelle zur Verdauung abgegeben wird. Durch das Bilden von Vesikeln auf der Membran kann auch eine erhöhte Granularität gemessen werden.
Nekrose	Im Vergleich zur Apoptose ist die Nekrose kein physiologischer Prozess. Hier gehen die Zellen unkontrolliert unter. Durch die Zerstörung der Membran, verliert diese ihre Integrität und wird durchlässig. Somit quillt die Zelle auf und es ist eine Vergrößerung zu beobachten.
NETose	Die „Neutrophil Extracellular Trap“ (NET) ist eine fibrilläre Matrix aus Chromatin und Granula-Protein, die aus den Granulozyten freigesetzt wird, um Bakterien zu bekämpfen. Während diesem Vorgang ist eine Vergrößerung der Zelle zu beobachten.
Toxische Granulation	Dies ist ein u.a. in Folge einer Infektion vorkommender Vorgang. Diese abnorme Granulabildung in den Granulozyten ist z.B. die Folge von Bakterienabbau.
Oxidativer Stress	Durch eine erhöhte Funktion der Mitochondrien, u.a. bei Stresssituationen, entstehen vermehrt freie reaktive Sauerstoffspezies. Diese können dann durch das Reagieren mit anderen Molekülen schädigend sein.

Tab. 3: Erläuterung der benötigten Marker und der Scatter plots (Erhöhung und Erniedrigung bezieht sich auf den Vergleich mit dem Normbereich, gemessen an Probanden). LC3: light chain 3, CD: Cluster of Differentiation.

<u>Marker</u>	<u>Bedeutung</u>
LC3:	Gibt das Stattfinden der Autophagie an: Eine Erhöhung bedeutet eine erhöhte Autophagie und umgekehrt.
CD107	Ist ein Maß für die Degranulation von Lysosomen beim Sattfinden von Abbauprozessen im Organismus: Eine Erhöhung deutet auf eine gesteigerte Degranulation und umgekehrt.
MitoTracker	Zeigt die Anzahl der Mitochondrien an: Eine Erhöhung bedeutet ein gesteigerte Mitochondrienanzahl und umgekehrt.
X-Mean (des forward scatters)	Gibt die Größe der einzelnen Zellen an.
Y-Mean (des side scatters)	Ist ein Maß für die Granulation der einzelnen Zellen: Mehr Granula in einer Zelle zeigen einen höheren Y-Mean und umgekehrt.
Granulozytenwinkel	Deutet darauf hin, ob sich die Zelle in einem apoptotischen oder nekrotischen Zustand befindet: Eine Erhöhung des Winkels bedeutet, dass die Zelle Apoptose betreibt, eine Erniedrigung Nekrose und/oder Netose

Tab. 4: Nachweiskriterien verschiedener Vorgänge.

	LC3: light chain 3	CD107: Cluster of Differen- tiation	Mito Tracker	Granulozyten- winkel	X-Mean im scatter plot	Y-Mean im scatter plot
Autophagie	+	+	+/-/-	=		
Apoptose	=/-	+	+/-/-	+		+
Netose		+	+/-/-	-	+	
Nekrose		+	+/-/-	-	+	
Toxische Granulation		+				+

### 2.3.2 Blutausstrich

Für die Blutausstriche hat man ebenfalls das EDTA-Blut verwendet. Der Blutausstrich wurde von uns in der klinischen Chemie mithilfe eines manuell bedienbaren Gerätes, das das Blut dünn auf den Objektträger ausstreicht, angefertigt. Der Vorteil dieses Gerätes war, dass die Blutausstriche eine hohe Qualität und Ähnlichkeit besaßen, was wiederum wichtig zum Vergleich war. Mit den Blutausstrichen wurden die Zellen mit Autophagie-Zeichen gezählt und mit den LC3-Messwerten der FACS-Analyse verglichen.

Für die Färbung der Blutausstriche wurde das Färbeset „Hemacolor“ der Firma Merck verwendet, das aus drei Lösungen bestand.

Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden drei Mal in der ersten Lösung, die Fixierlösung, die Methanol enthält, kurz vollständig eingetaucht. Dies bewirkte eine Fixierung der Zellen.

Im zweiten Schritt wurden die fixierten Blutausstriche in der zweiten Lösung, den roten Farbstoff, Eosin, vier Mal eingetaucht. Dies bewirkte eine Färbung der basischen Zellbestandteile.

Die dritte Lösung war das blaue Farbreagenz, das Azur enthält. In dieser Lösung wurden die Blutausstriche fünf Mal eingetaucht. Hier wurden die sauren Zellbestandteile gefärbt.

Schließlich wurde unter laufendem Wasser die überschüssige Farbe abgewaschen.

Nachdem die Blutausstriche luftgetrocknet wurden konnten diese unter dem Mikroskop

untersucht werden.

Durch den unterschiedlichen Gehalt an sauren und basischen Bestandteilen der verschiedenen Zellen konnten diese unterschieden werden. Die Farben reichten von rötlich-rot über violett bis hin zu blau. Die Zellkerne werden dabei z.B. rot bis violett gefärbt und die verschiedenen Granulozyten können dann u.a. an ihren unterschiedlich geformten Kernen unterschieden werden.

Die Aufmerksamkeit wurde hauptsächlich auf den Nachweis von Autophagie gerichtet. Diese konnte man an den „leeren Bläschen“ in den Zellen erkennen [21, 23].

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von sechs Monaten wurden 21 Patienten aufgenommen und untersucht. Sie wurden in drei Gruppen eingeteilt. Von den 21 Patienten waren 10 in der Post OP mit einem Polytrauma-Gruppe, 17 in der Post OP-Gruppe, die auch die Polytraumapatienten enthält, und 7 in der Prae mortem-Gruppe. Viele Patienten waren in mehreren Gruppen einzuordnen, somit gibt es eine höhere Anzahl an Analysen, als tatsächliche Patienten. Die Post OP-Gruppe wurde nochmals unterteilt in die Post Notfall OP -Gruppe mit 7 Patienten und die Post OP mit Polytrauma-Gruppe mit 10 Patienten (Abb. 6).

Die Patienten befanden sich im Alter von 4 bis 85 Jahren, wobei das Durchschnittsalter 46 betrug. Das Durchschnittsalter der Post OP-Gruppe war 40 Jahre. Das Durchschnittsalter der Patienten der Polytrauma-Gruppe lag bei 26 Jahren. Die Prae mortem-Gruppe wies mit 66 Jahren sowie die Notfall OP-Gruppe mit 60 Jahren ein hohes Durchschnittsalter auf (Kapitel 2.1; Tab. 1).

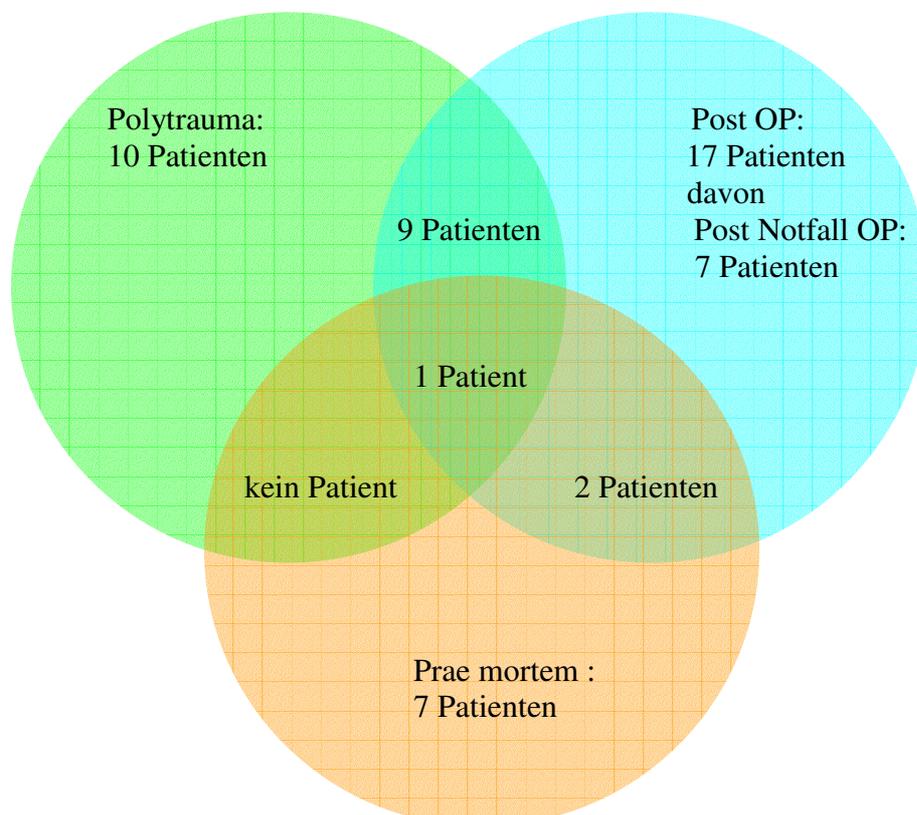


Abb. 6 Patientenkollektiv. OP: Operation

Unter den Patienten war keiner, der ein reines Polytrauma hatte, ohne operiert werden zu müssen. Die Kontrollgruppe bestand aus 21 Labormitarbeitern und Praktikanten. Aus diesen Messwerten wurden die Mittelwerte der einzelnen Marker ermittelt. Außerdem wurden zwei „gesunde“ Patienten, die zwar Stressfaktoren besaßen, aber zum Messzeitpunkt wieder auf den Weg der Besserung waren, untersucht. Ihre Werte wichen nur leicht von der Kontrollgruppe ab.

## **3.2 Auswertung der Messdaten**

### **3.2.1 Der LC3-Marker als Nachweis der Autophagie**

Als Bestätigung, dass der LC3-Marker ein zuverlässiger Marker der Autophagie ist, wurden aus derselben Blutprobe, aus der die FACS-Analyse durchgeführt wurde, auch Blutausstriche angefertigt und unter dem Mikroskop untersucht. Bei den ersten Patienten unserer Untersuchungsgruppe wurde diese Untersuchung durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass bei erhöhten LC3-Werten eine starke Häufung von Granulozyten, in denen der Vorgang der Autophagie zu sehen war, zu finden war. Somit konnte der LC3-Marker verwendet werden, um eine Aussage über den Grad des Vorkommens der Autophagie in einer Blutprobe zu machen.

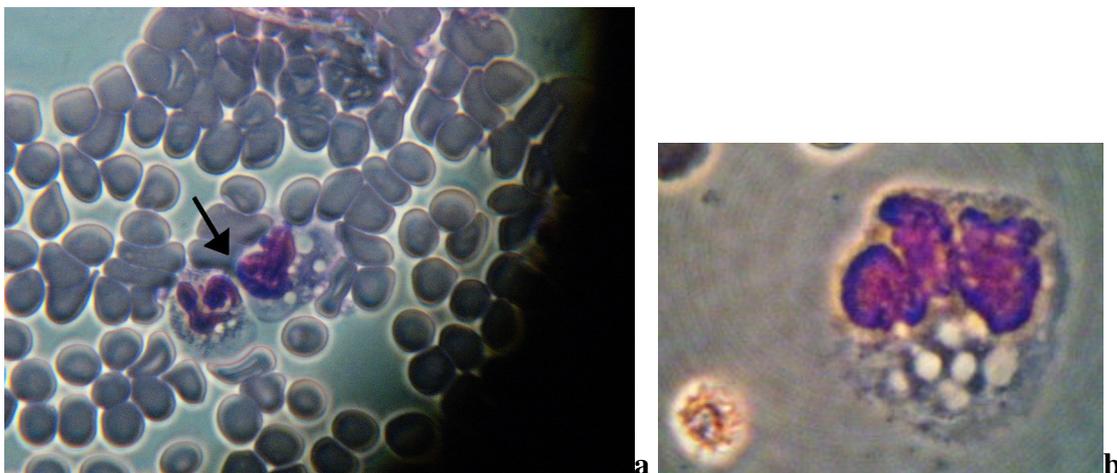


Abb.7 Autophagie in den Granulozyten. Im Bild sind massenhaft Erythrozyten zu sehen und mit dem Pfeil gekennzeichnet zwei Granulozyten (a). Die Vakuolen in den Granulozyten deuten auf die Autophagie hin (b).

### 3.2.2 Autophagienachweis anhand des LC3-Markers in den verschiedenen Patientengruppen

Im Folgenden wird anhand von Schaubildern mit den LC3-Werten der verschiedenen Messzeitpunkten der Patienten dargestellt, bei wie viele Patienten Autophagie nachzuweisen war.

In der Abb.8 werden die LC3-Messwerte der Patienten der Post OP-Gruppe dargestellt. Mit im Schaubild enthalten sind auch die Patienten der Polytrauma-Gruppe, da diese auch operiert wurden und in der Post OP-Gruppe einzuordnen sind.

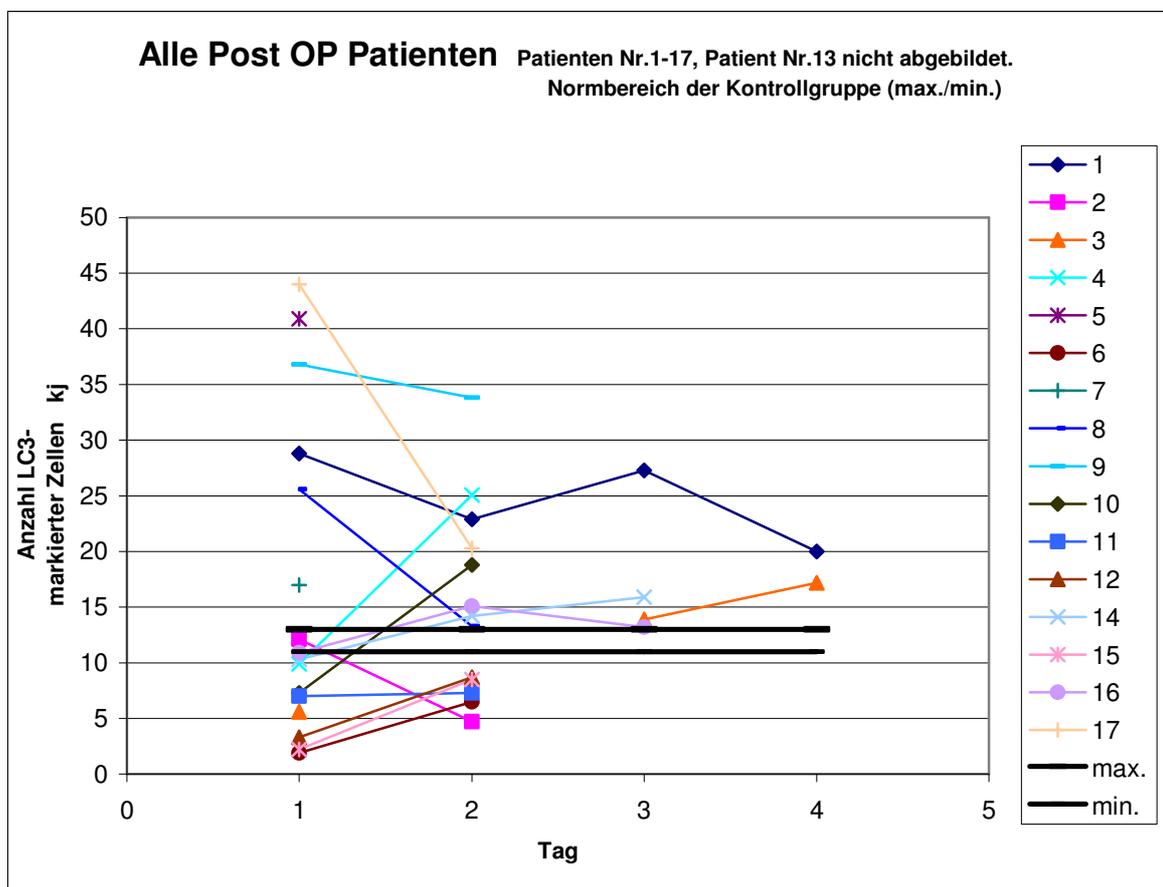


Abb. 8: Verlauf der LC3-Werte der Post OP Patienten nach OP (Tag 0). Der Patient 13 ist in Abb.8 nicht dargestellt, da keine Messungen an den Tagen unmittelbar nach der Operation enthalten sind. Die X-Achse ist mit den Tagen beschriftet, wobei Tag 1 der Tag nach der Operation ist und die weiteren Tage sind die darauf folgenden. Auf der Y-Achse können die LC3-Werte abgelesen werden. In der Legende rechts sind mit den Ziffern die Patienten aufgelistet. Die zwei waagerechten Geraden mit der Beschriftung min. und max. zeigen den Normbereich des LC3-Wertes an, der an der Kontrollgruppe ermittelt wurde. OP: Operation, LC3: light chain 3.

Die LC3-Werte der Patienten sind sowohl oberhalb, als auch unterhalb der Norm zu beobachten. Im erhöhten Bereich sind 11 Patienten vorzufinden. Es sind im zweiten postoperativen Tag Anstiege (n= 9) und Abfälle (n= 5) zu beobachten (Abb.8).

Die Abb.9 zeigt links die Patienten der Post Notfall OP-Gruppe und rechts die der Post OP mit Polytrauma-Gruppe.

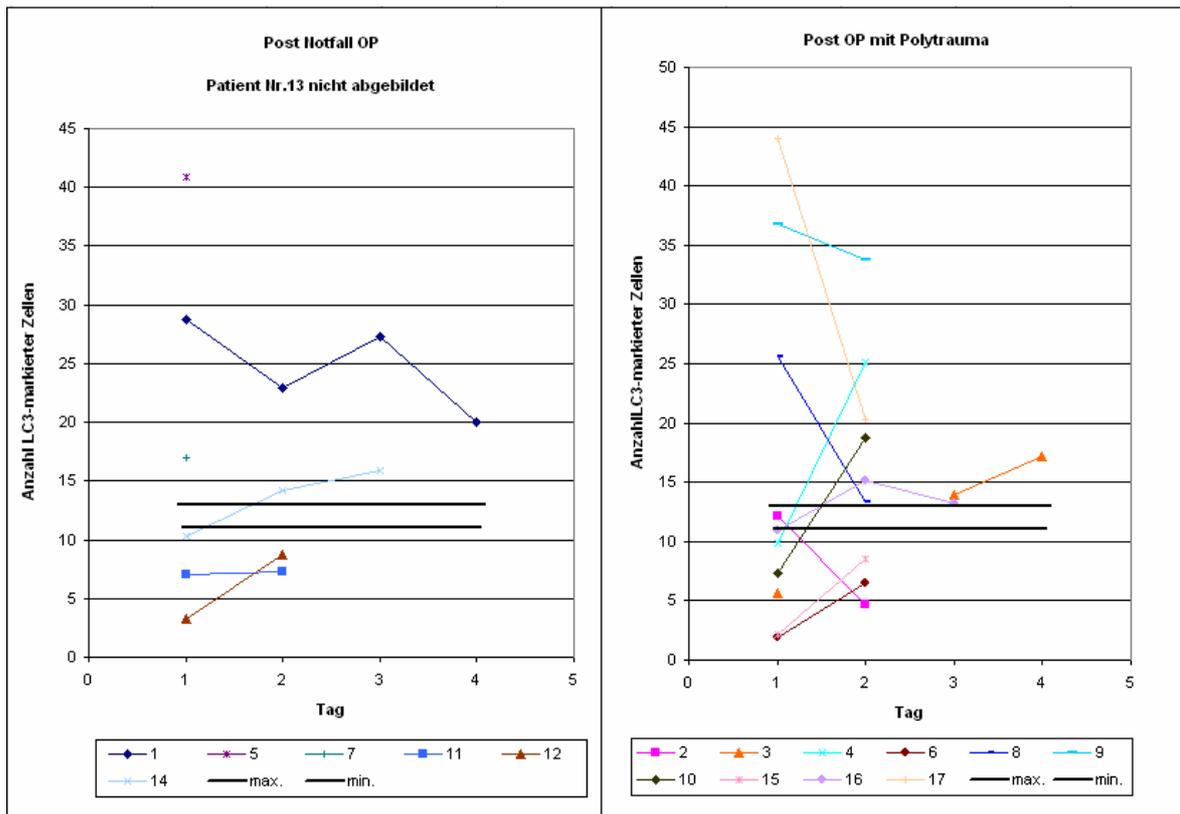


Abb. 9: Vergleich der LC3-Werte der Post Notfall OP- und Post OP mit Polytrauma-Gruppe. OP: Operation, Nr.: Nummer, LC3: light chain, max: Maximum, min: Minimum.

Es sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu beobachten. Sowohl in der Patientengruppe im Notfall operierter, als auch in der Gruppe der operierten polytraumatisierten Patienten ist die Verteilung erhöhter und erniedrigter LC3-Werte ähnlich. Anstiege sind öfter bei der Polytrauma-Gruppe zu beobachten (Abb.9).

Die Abb.10 zeigt die LC3-Werte im Verlauf der Patienten kurz vor ihrem Versterben.

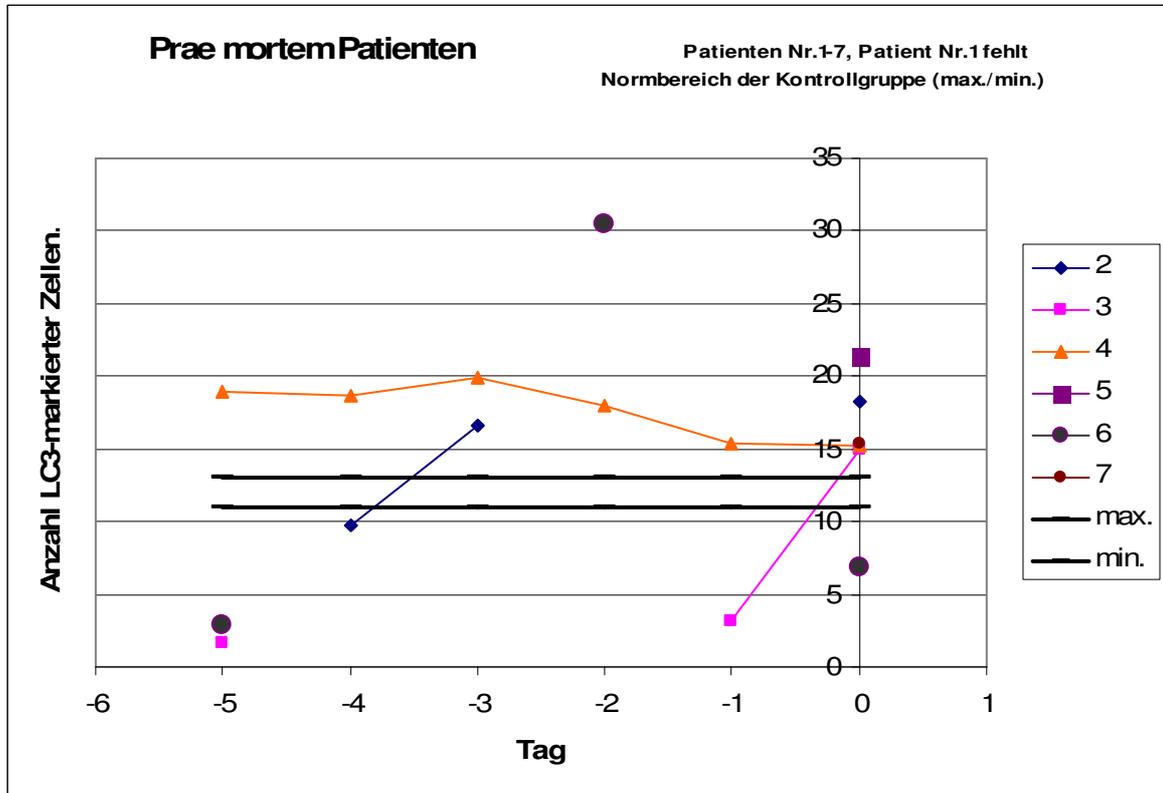


Abb. 10: Verlauf der LC3-Werte der Prae mortem Patienten vor dem Tod (Tag 0). Der Tag 0 ist der Todestag der Patienten und die Tage vor ihrem Tod sind mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Die Zwei schwarzen Geraden stellen den Normbereich dar. Pat. Nr. 1 ist nicht dargestellt, da kein LC3-Wert am Todestag enthalten ist. Dieser Patient zeigte LC3-Werte im niedrigen Bereich bis zum Normbereich. Nr.: Nummer, max: Maximum, min: Minimum, LC3: light chain 3, Pat. Nr. : Patient Nummer.

Am Todestag zeigen die meisten Patienten (5/6) LC3-Werte im erhöhten Bereich. Zum Todestag sind sowohl Anstiege (n= 3), als auch Abfälle (n= 1) zu beobachten. Im Vergleich zu der Post OP-Gruppe sind vergleichbar hohe LC3-Werte zu beobachten. Sehr stark erhöhte Werte am Todestag gibt es aber nicht, wie im Vergleich der Post OP-Gruppe mit Werten über 25 (Abb. 10 und Abb. 8). Patient Nr.6 zeigt zwei Tage vor seinem Tod eine sehr starke Erhöhung des LC3-Wertes (Abb. 10). An diesem Tag hat der Patient bei Zustand nach Colon-CA und Platzbauch eine Woche vor dem Tod zusätzlich Volumen (HÄS-Lösung), vier Erythrozytenkonzentrate und Tranexansäure bekommen.

## Zusammenfassung LC3

Zusammenfassend stellt Tab.5 dar, bei wie vielen Patienten Autophagie anhand der erhöhten LC3-Werte nachgewiesen wurde.

Tab. 5: Erhöhtes Autophagieauftreten bei den Patienten in den verschiedenen Gruppen mittels LC3-Marker. LC3: light chain 3, OP: Operation.

Gruppe:	Autophagie bei	Von insgesamt ... Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit erhöhten LC3-Werten
Alle Post OP- Patienten	13	17	76
Post OP (Notfall)	6	7	86
Post OP (mit Polytrauma)	7	10	70
Prae mortem	6	7	86

Bei den Patienten der Prae mortem-Gruppe und der Post Notfall OP-Gruppe wurde mit nahezu 90 Prozent am stärksten Autophagie nachgewiesen.

Es zeigten aber nicht wie erwartet alle Patienten eine erhöhte Autophagie (Kapitel 3.2.1). Bei der Post OP Polytrauma-Gruppe waren es drei Patienten, die keine erhöhte Autophagie aufwiesen, bei der Prae mortem-Gruppe und der Post Notfall OP-Gruppe nur einer (Tab. 5).

### **3.2.3 Degranulation der Lysosomen anhand des CD107-Markers in den verschiedenen Patientengruppen**

Mit dem CD107-Marker können in der Zelle Abbauvorgänge festgestellt werden, da dieser der Marker für die Degranulation der Lysosomen ist.

Im Folgenden wird anhand von Schaubildern mit den CD107-Werten der verschiedenen Messzeitpunkte der Patienten dargestellt, bei wie viele Patienten eine erhöhte Degranulation, ein Nachweis von Abbauvorgängen, in den Zellen nachzuweisen war.

In der Abb. 11 werden die CD107-Messwerte der Patienten der Post OP-Gruppe dargestellt. Im Schaubild sind auch die Patienten der Polytrauma-Gruppe enthalten, da diese auch operiert wurden und auch in der Post OP-Gruppe einzuordnen sind.

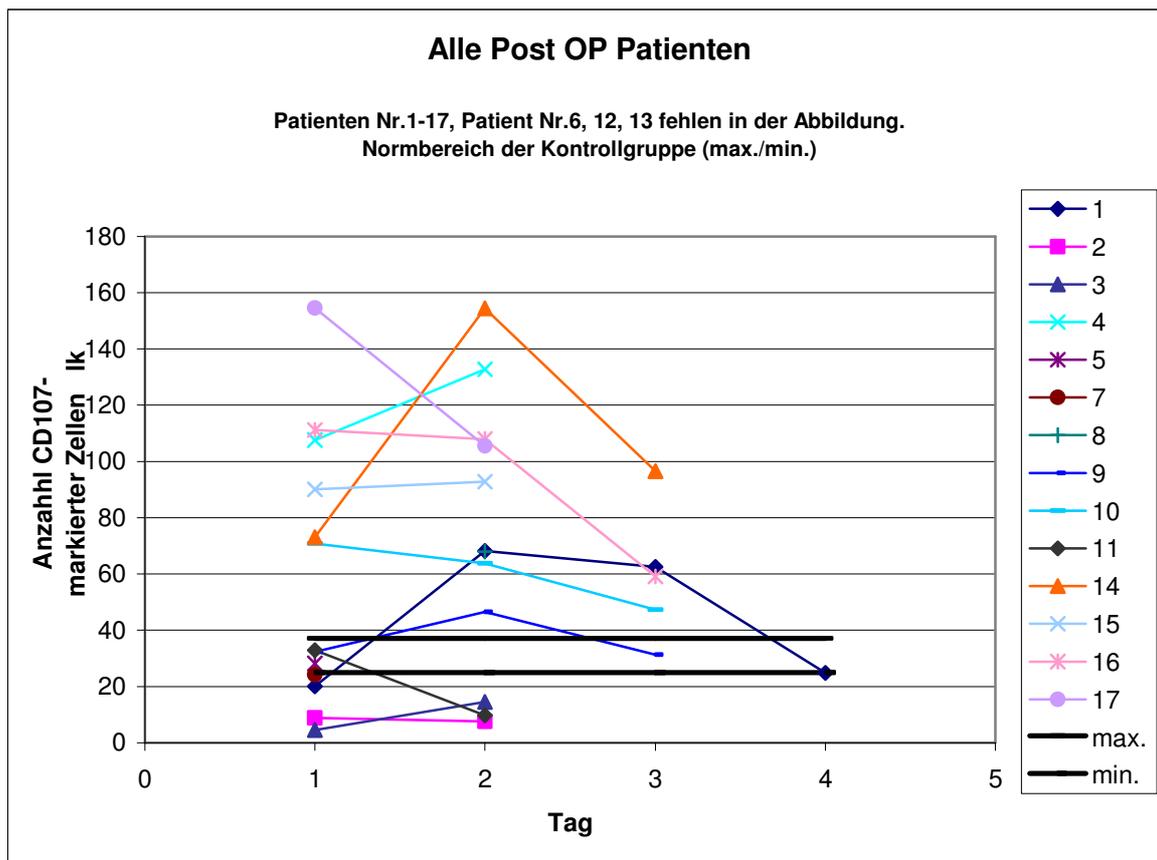


Abb. 11: Verlauf der CD107-Werte der Post OP Patienten nach OP (Tag 0). Von Patienten Nr.6 sind keine CD107-Messwerte vorhanden und bei den Patienten Nr.12 und Nr.13 sind keine Messwerte unmittelbar nach der Operation gemessen worden. Somit sind diese Patienten nicht im Schaubild dargestellt. Die X-Achse ist mit den Tagen beschriftet, wobei Tag 1 der Tag nach der Operation ist und die weiteren Tage sind die darauf folgenden. Auf der Y-Achse können die CD107-Werte abgelesen werden. In der Legende rechts sind mit den Ziffern die Patienten aufgelistet. Die zwei waagerechten Geraden mit der Beschriftung min. und max. zeigen den Normbereich des CD107-Markers an, der an der Kontrollgruppe ermittelt wurde. OP: Operation, Nr.: Nummer, max: Maximum, min: Minimum, CD: Cluster of Differentiation.

Die meisten Patienten weisen nach einem operativen Eingriff CD107-Werte auf, die im Verlauf der ersten zwei postoperativen Tage den Normbereich überschreiten. Es sind sowohl Anstiege (n= 6), als auch Abfälle (n= 5) zu beobachten (Abb. 11).

Die Abb. 12 zeigt links die Patienten der Post Notfall OP-Gruppe und rechts die der Post OP mit Polytrauma-Gruppe.

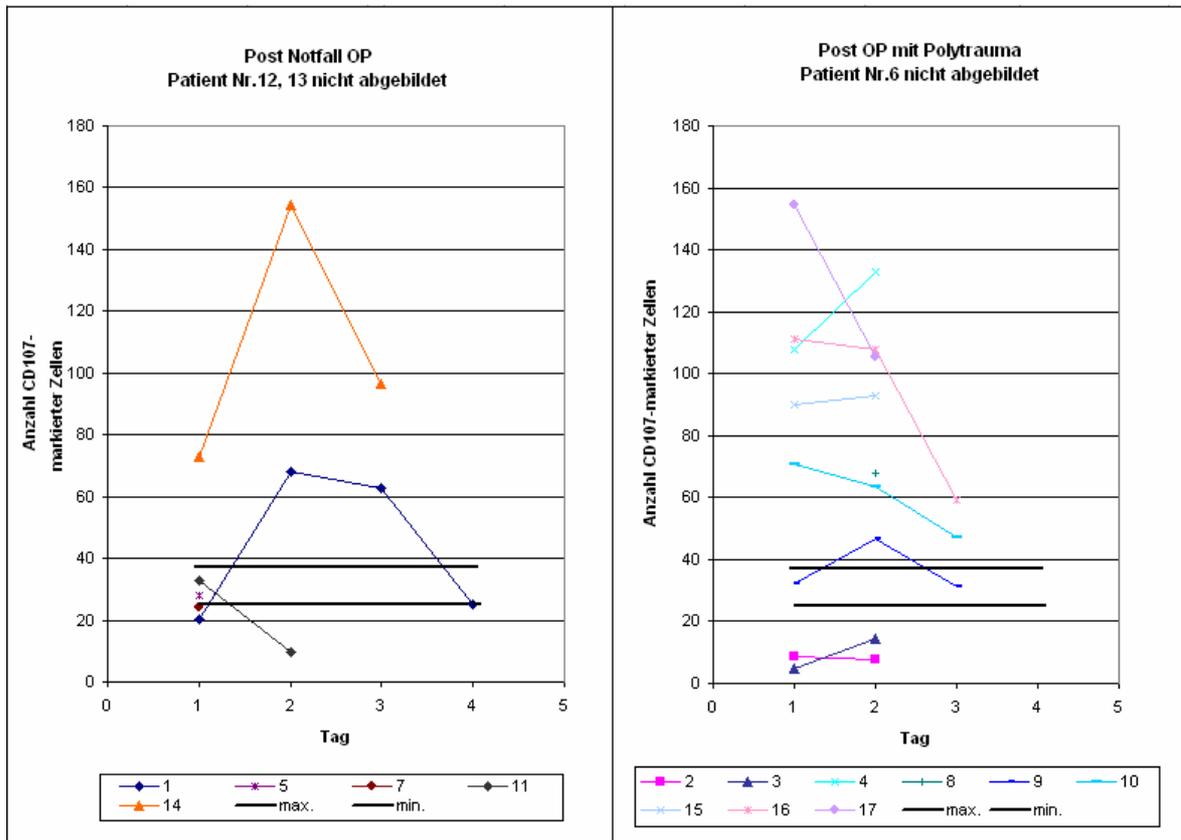


Abb. 12: Vergleich der CD107-Werte der Post Notfall OP- und der Post OP mit Polytrauma-Gruppe. OP: Operation, Nr. Nummer, CD: Cluster of Differentiation, max.: Maximum, min.: Minimum.

Im Vergleich der Notfall OP-Gruppe und der Polytrauma-Gruppe sind ähnlich viele CD107-Werte im erhöhten Bereich und im erniedrigten Bereich zu beobachten. Im Vergleich der zwei Gruppen zeigt die Polytrauma-Gruppe (CD107-Werte bis ca. 160) deutlich höhere CD107-Werte am ersten postoperativen Tag, als die Post Notfall OP-Gruppe (CD107-Werte bis ca. 70). Es sind bei beiden Gruppen Anstiege und Abfälle der Werte zu beobachten (Abb. 12).

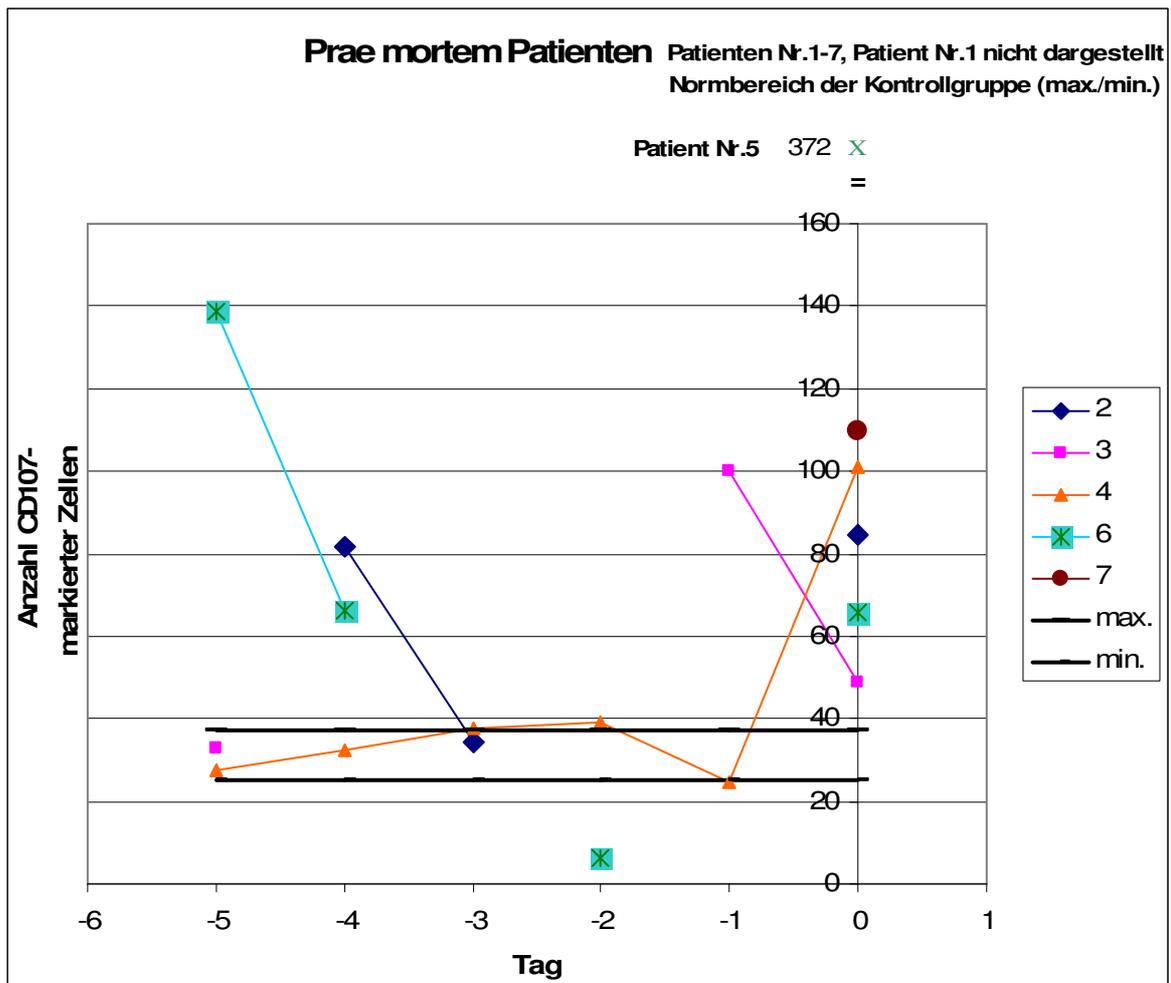


Abb. 13: Verlauf der CD107-Werte der Prae mortem-Patienten vor dem Tod (Tag 0). Der Tag 0 ist der Todestag der Patienten und die Tage vor ihrem Tod sind mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Die zwei schwarzen Geraden stellen den Normbereich dar. Patient Nr. 1 ist nicht im Schaubild dargestellt, da kein CD107-Wert am Todestag vorhanden ist. Dieser Patient zeigte CD107-Werte im erniedrigten Bereich. Patient Nr.5 zeigt einen sehr stark erhöhten CD107-Wert am Todestag. Der Wert beträgt 372. Nr.: Nummer, CD: Cluster of Differentiation, max.: Maximum, min.: Minimum.

Alle Patienten, von denen ein Wert am Todestag vorhanden war, zeigen am Todestag erhöhte CD-107-Werte. Es sind mehr Anstiege (n= 3), als Abfälle (n= 1) zu beobachten. Im Vergleich zu den Post OP-Patienten weisen die Patienten der Post OP-Gruppe stärker erhöhte und erniedrigte CD107-Werte auf (Abb. 13 und Abb. 11). Patient Nr.6 zeigt einen sehr stark erniedrigten CD107-Wert am zweiten Tag vor seinem Versterben. Dieser Patient hatte fünf Tage zuvor einen akuten Platzbauch.

## Zusammenfassung CD107

Zusammenfassend stellt die Tab. 6 dar, bei wie vielen Patienten, anhand erhöhter CD107-Werte ein erhöhter Abbau nachgewiesen wurde.

Tab. 6: Erhöhte Degranulation bei den Patienten in den verschiedenen Gruppen mittels CD107-Marker. OP: Operation, CD: Cluster of Differentiation.

Gruppe:	Erhöhte Degranulation bei	Von insgesamt ... Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit erhöhten CD107-Werten
Alle Post OP-Patienten	11	17	65
Post OP (Notfall)	4	7	57
Post OP (mit Polytrauma)	7	10	70
Prae mortem	6	7	86

Die Patienten der Prae mortem-Gruppe weisen mit nahezu 90% den stärksten Abbau nach. In der Prae mortem-Gruppe zeigen 100% der Patienten einen erhöhten Abbau am Todestag von denen ein Wert am Todestag vorhanden ist. Den kleinsten Anteil an Patienten, die einen erhöhten Abbau zeigten, hatte die Notfall OP-Gruppe mit unter 60 Prozent (Tab. 6). Es zeigten nicht alle Patienten einen erhöhten Abbaunachweis, die auch eine erhöhte Autophagie zeigten, wenn man diese Ergebnisse mit denen der LC3-Messungen vergleicht (Kapitel 3.2.5.1; Tab. 8).

### **3.2.4 Mitochondrienanzahl mittels MitoTracker (MT) in den verschiedenen Patientengruppen**

Die Mitochondrienanzahl wurde mittels des MitoTracker-Markers gemessen. Dieser Marker kann auf die Zahl der Mitochondrien bezogen werden.

Im Folgenden wird über die Mitochondrienanzahl in den verschiedenen Patientengruppen berichtet.

Anhand von Schaubildern mit den MitoTracker-Werten der verschiedenen Messzeitpunkte der Patienten wird dargestellt, bei wie viele Patienten eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien in den Zellen nachzuweisen war.

In Abb. 14 werden die MT-Messwerte der Patienten der Post OP-Gruppe dargestellt. Mit im Schaubild sind auch die Patienten der Polytraumagruppe enthalten, da diese auch operiert wurden und auch in der Post OP-Gruppe einzuordnen sind.

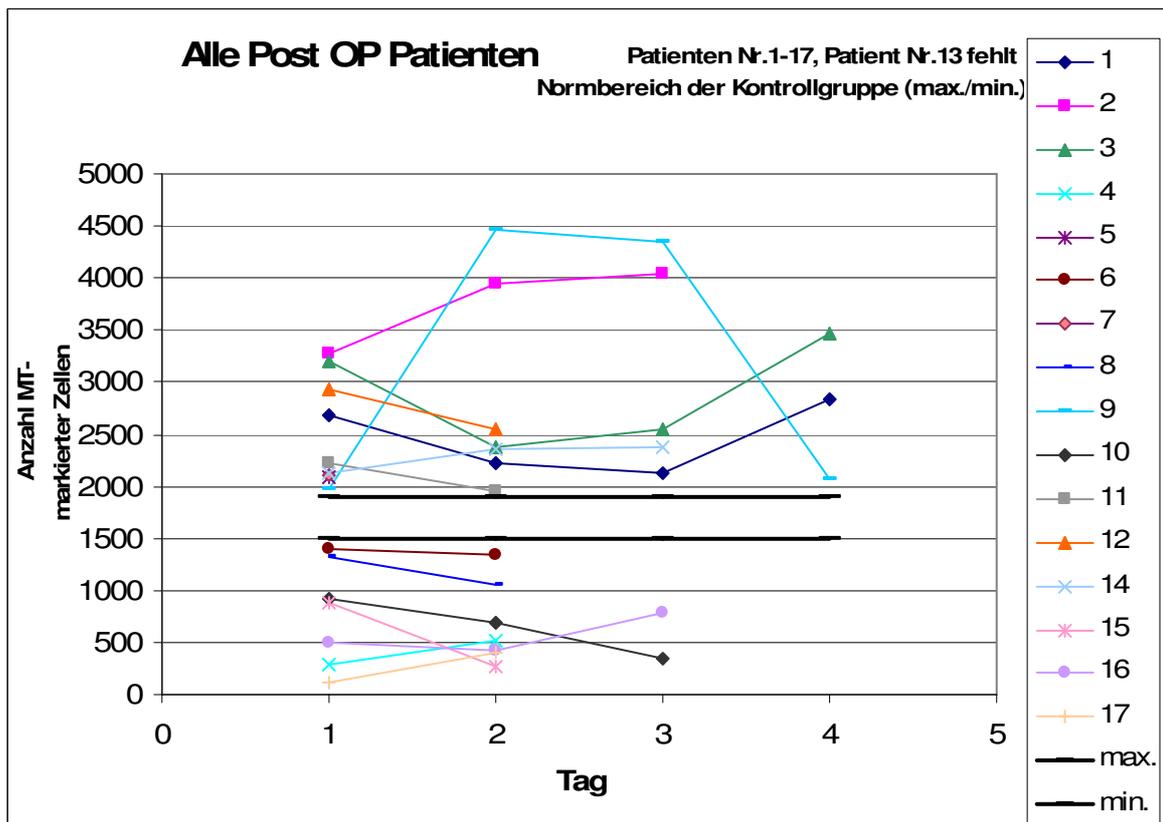


Abb. 14: Verlauf der MT-Werte der Post OP-Patienten nach OP (Tag 0). Patient Nr.13 ist im Schaubild nicht dargestellt, weil keine Messwerte unmittelbar nach der Operation vorhanden sind. Die X-Achse gibt die Tage an, wobei Tag 1 der Tag nach der Operation ist und die weiteren Tage die darauf folgenden. Auf der Y-Achse können die MT-Werte abgelesen werden. In der Legende rechts sind mit den Ziffern die Patienten aufgelistet. Die zwei waagerechten Geraden mit der Beschriftung min. und max. zeigen den Normbereich des MT-Markers an, der in der Kontrollgruppe ermittelt wurde. OP: Operation, Nr.: Nummer, MT: MitoTracker, max.: Maximum, min.: Minimum.

Es sind sowohl MT-Werte über dem Normbereich, als auch unter dem Normbereich zu beobachten. Die Anzahl der Patienten über und unter dem Normbereich ist ähnlich. Es sind Anstiege (n= 5) und Abfälle (n= 9) enthalten. Der MT-Marker zeigt im Gegensatz zu dem LC3- und CD107-Marker mehr Abfälle, als Anstiege. Die Patienten zeigen trotz Anstiegen und Abfällen keine Wechsel vom erhöhten in den erniedrigten Bereich und umgekehrt (Abb. 14).

Abb. 15 zeigt links die Patienten der Post Notfall OP-Gruppe und rechts die der Post OP mit Polytrauma-Gruppe.

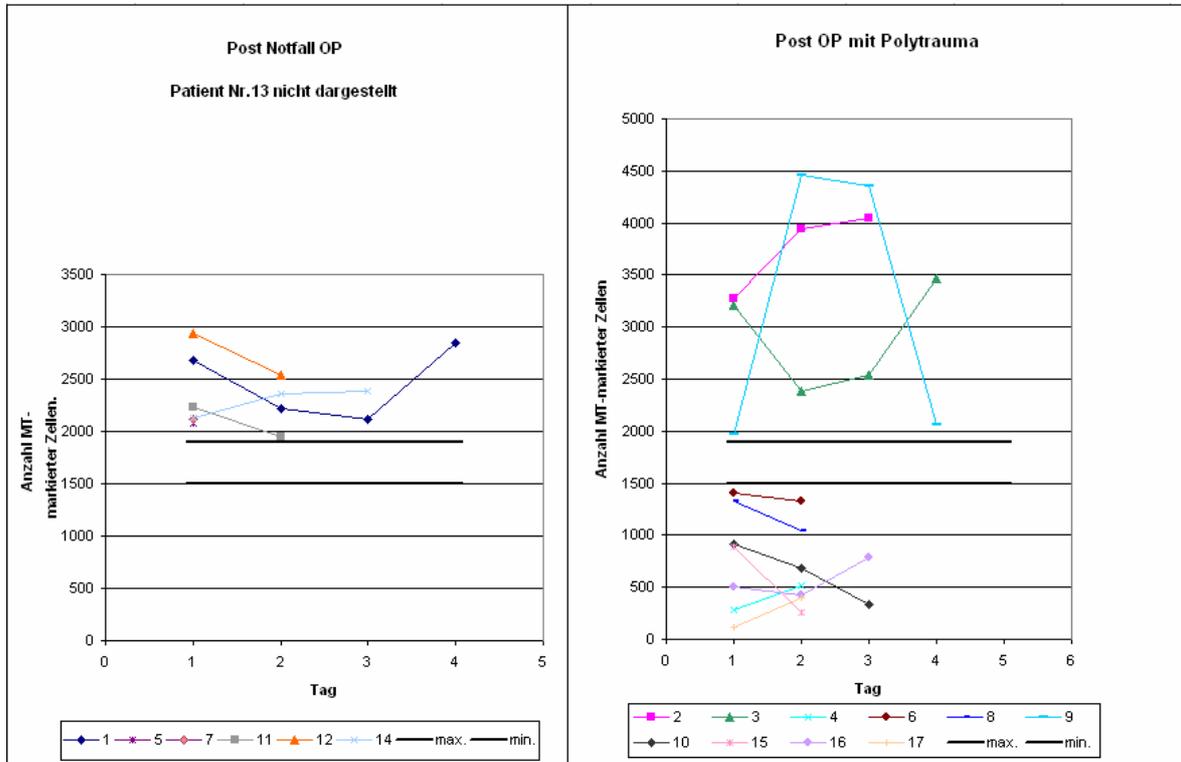


Abb. 15: Vergleich der MT-Werte der Post Notfall OP- und der Post OP mit Polytrauma-Gruppe. OP: Operation, Nr.: Nummer, MT: MitoTracker, max.: Maximum, min.: Minimum.

Es ist zu beobachten, dass alle Post Notfall OP-Patienten die Normwerte überschreiten und die meisten Polytrauma-Patienten die Normwerte unterschreiten. Die Polytrauma-Patienten weisen höhere Spitzenwerte als den Notfall OP-Patienten auf. Es sind in beiden Gruppen sowohl Anstiege als auch Abfälle der MT-Werte zu beobachten (Abb. 15). Patient Nr.9 zeigt einen sehr starken Anstieg (MT-Wert: 4500). Dieser 18-jährige Polytrauma-Patient erhielt am Vortag über 30 Erythrozytenkonzentrate.

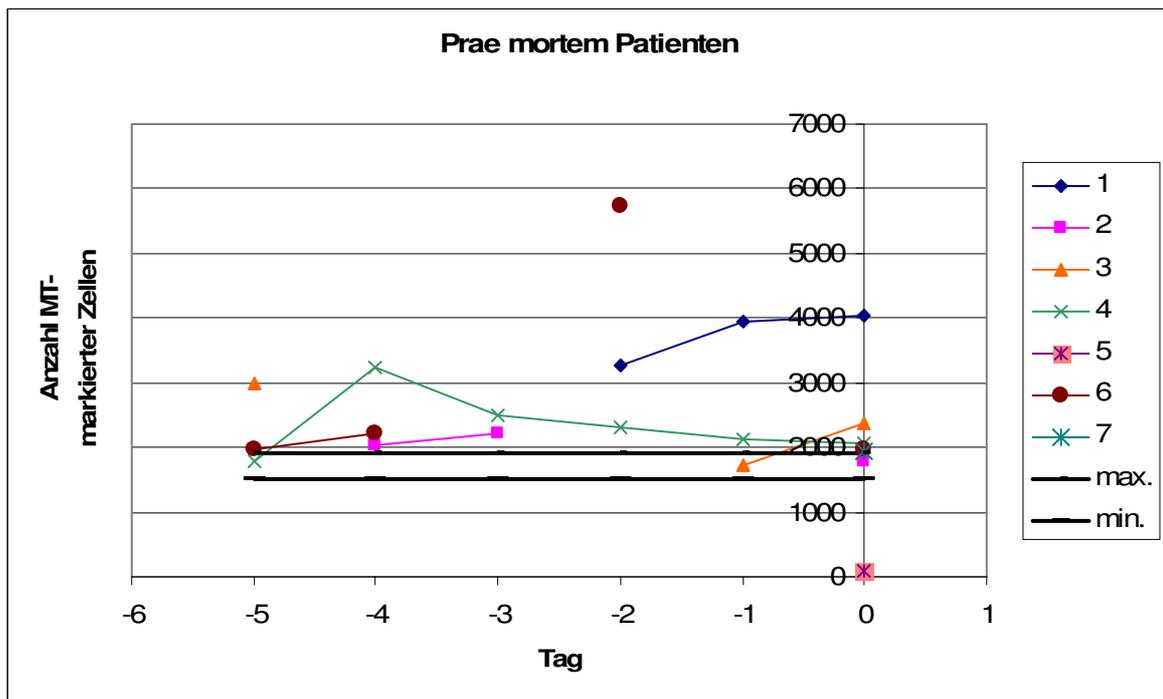


Abb. 16: Verlauf der MT-Werte der Prae mortem Patienten vor dem Tod (Tag 0). Im Schaubild sind die MT-Werte der Patienten der Prae mortem-Gruppe dargestellt. Der Tag 0 ist der Todestag der Patienten und die Tage vor ihrem Tod sind mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Die zwei schwarzen Geraden stellen den Normbereich dar. MT: MitoTracker, max.: Maximum, min.: Minimum.

Die MT-Werte liegen nahe dem Normbereich. Die meisten Messwerte liegen oberhalb der Normwerte. Zum Todestag sind sowohl Anstiege (n= 2), als auch Abfälle (n= 3) zu beobachten (Abb. 16). Vergleicht man die drei Gruppen miteinander sieht man, dass sich die MT-Werte bei der Notfall OP-Gruppe um 2500, bei der Polytrauma-Gruppe um 1000 und bei der Prae mortem-Gruppe um 2000 liegen (Abb. 16 und 15).

## Zusammenfassung MitoTracker

Zusammenfassend stellt die folgende Tabelle dar, bei wie vielen Patienten anhand erhöhter MT-Werte eine erhöhte Mitochondrienanzahl nachgewiesen wurde.

Tab. 7: Erhöhte Mitochondrienanzahl bei den Patienten in den verschiedenen Gruppen mittels MT-Marker. OP: Operation, MT: MitoTracker.

Gruppe:	Erhöhte Mitochondrien-Anzahl bei	Von insgesamt ... Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit erhöhten MT-Werten
Alle Post OP-Patienten	10	17	59
Post OP (Notfall)	7	7	100
Post OP (mit Polytrauma)	3	10	30
Prae mortem	7	7	100

Es ist ein großer Unterschied zwischen den Post OP-Patienten und den Prae mortem-Patienten zu beobachten. Bei der Aufteilung der Post OP-Gruppe zeigt sich, dass nur 1/3 der Polytrauma-Patienten erhöhte MT-Werte aufweisen. (Tab. 7).

### 3.2.5 Kombinationen von Markern

Die einzelnen Marker wurden bei den einzelnen Patientengruppen getrennt untersucht. Weiterhin wurden die Zusammenhänge verschiedener Marker und deren Bedeutung untersucht.

### **3.2.5.1 LC3- und CD107-Marker**

Eine LC3-Erhöpfung bedeutet, dass verstärkt Autophagie betrieben wird. Beim Abbau von Fremd- oder Eigenmaterial schütten die Lysosomen ihren Inhalt aus. Daher ist bei einer LC3-Erhöpfung eine erhöhte Degranulation zu erwarten, die messbar anhand einer CD107-Erhöpfung ist.

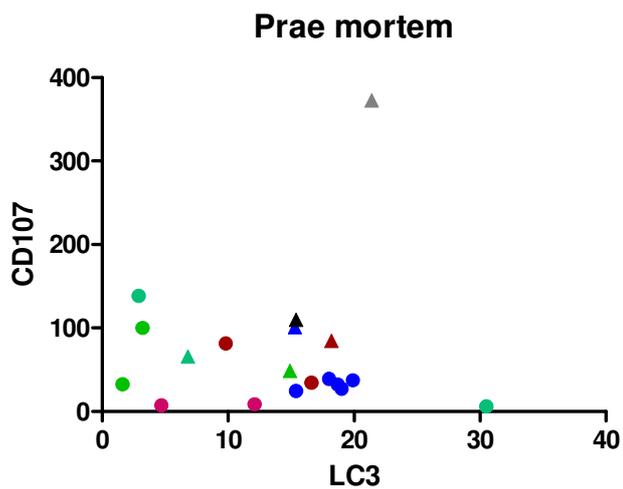
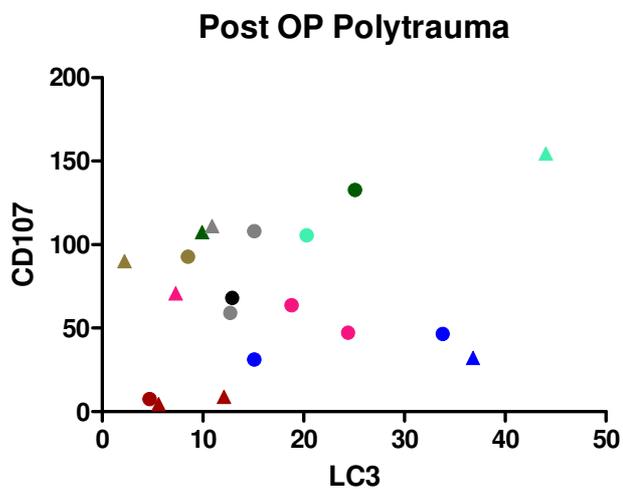
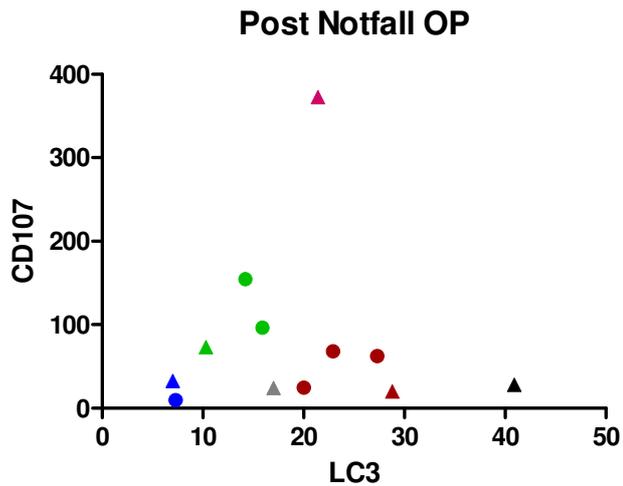


Abb. 17: Die drei Schaubilder zeigen die Anzahl der LC3 markierten und CD107 markierten Zellen in den drei Patientengruppen an. Mit einem Dreieck gekennzeichnet sind bei den Post Notfall OP und Post OP mit Polytrauma Patienten die Werte der jeweiligen Patienten am ersten post OP Tag. Bei der Prae mortem-Gruppe kennzeichnen die Dreieckigen Symbole den Todestag. Die Farben kennzeichnen die zu einem Patienten gehörigen Wertepaare. LC3: light chain 3, CD: Cluster of Differentiation, OP: Operation.

Für jede Gruppe getrennt wurde der Zusammenhang des LC3- und CD107-Markers untersucht. Bei über 2/3 der Messungen wurde eine gleichzeitige Erhöhung beobachtet (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammenhang einer LC3-Erhöhung mit einer CD107-Erhöhung. LC3: light chain 3, CD: Cluster of Differentiation, OP: Operation.

Patientengruppe	LC3-Erhöhung und CD107-Erhöhung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten LC3 und CD107-Werten
Alle Post OP-Patienten	16	22	73
Post OP (Notfall)	5	9	56
Post OP (mit Polytrauma)	11	13	85
Prae mortem	10	13	77

Bei der Polytrauma-Gruppe wurde die höchste Übereinstimmung beobachtet. Es wurde am meisten Abbau durch den Vorgang der Autophagie betrieben (Tab. 8).

### 3.2.5.2 LC3- und MT-Marker

Tab. 9: Zeigt die Messungen, bei denen eine gleichzeitige MT-Erniedrigung von den Messungen mit einer LC3-Erhöhung zu beobachten war. MT: MitoTracker, LC3: light chain 3, OP: Operation.

Patientengruppe	MT-Erniedrigung bei LC3-Erhöhung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten LC3 und niedrigen MT-Werten
Alle Post OP-Patienten	12	26	46
Post OP (Notfall)	1	10	10
Post OP (mit Polytrauma)	11	16	69
Prae mortem	1	14	7

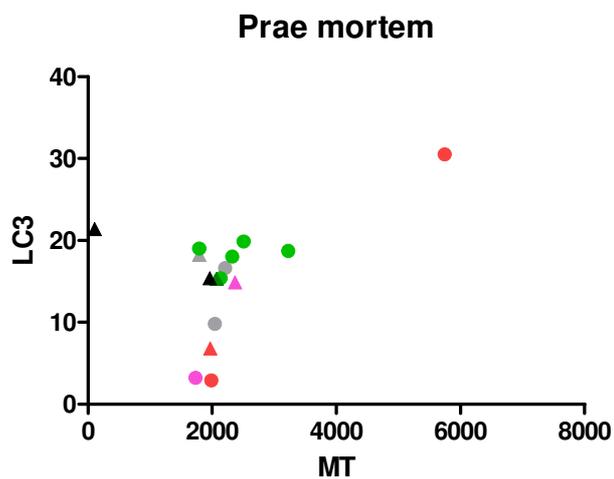
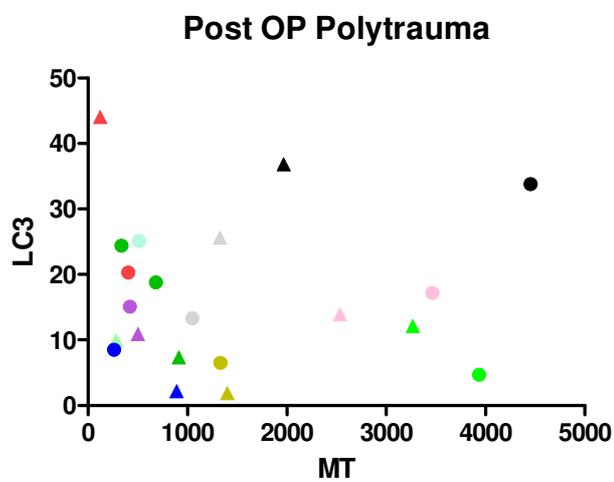
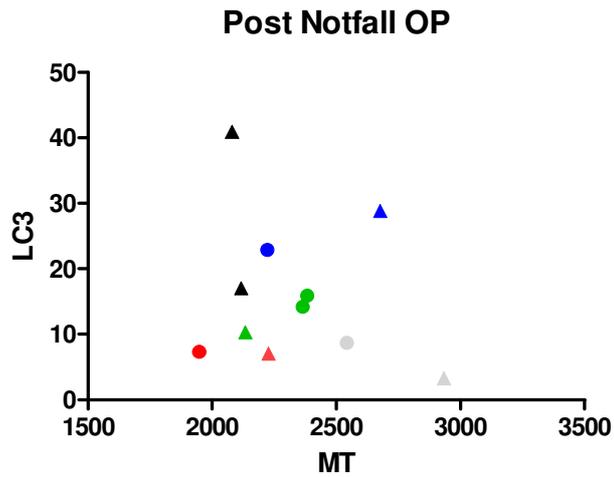


Abb. 18: Diese drei Schaubilder zeigen die Anzahl der mit LC3 markierten und MT markierten Zellen an. Die dreieckigen Symbole zeigen bei den Post Notfall OP und Post OP mit Polytrauma Patienten den ersten postoperativen Tag und bei der Prae mortem Gruppe den Todestag. Die Farben zeigen die Messpaare, die zum gleichen Patienten gehören. In der Prae mortem-Gruppe hielten sich die MT-Werte nahezu aller Patienten im Bereich 2000 auf. OP: Operation, LC3: light chain 3, MT: MitoTracker.

### 3.2.5.3 MitoTracker und CD107

Es ist bekannt, dass eine erhöhte Mitochondrienfunktion zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen kann. Dies führt zu Schäden in den Zellen, u.a. durch DNA-Strangbrüche. Aus diesem Grund würden dann diese Zellen abgebaut werden, sodass auch ein erhöhter Abbau bei diesen Patienten zu beobachten wäre. Die folgenden Untersuchungen (Tab. 11, 12a und 12b) zeigen, ob dies durch den Vorgang der Autophagie erfolgt.

Eine MitoTracker-Erhöhung war bei 2/3 der gesamten Messungen mit einer CD107-Erhöhung assoziiert (Tab. 10).

Tab. 10: Einhergehen einer CD107-Erhöhung mit einer MT-Erhöhung. CD: Cluster of Differentiation, MT: MitoTracker, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erhöhung bei MT-Erhöhung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten CD107-Werten bei erhöhten MT-Werten
Alle Post OP-Patienten	12	23	52
Post OP (Notfall)	11	17	65
Post OP (mit Polytrauma)	1	6	17
Prae mortem	16	21	76

Die Patienten der Prae mortem-Gruppe zeigten den größten Zusammenhang (Tab. 10). Diese Patienten zeigten bei den meisten Messungen erhöhte MT-Werte. Bei den Polytrauma-Patienten hingegen waren die MitoTrackermessungen erniedrigt (siehe: Kapitel 3.2.4). Zudem war bei den Polytrauma-Patienten eine Erhöhung des MT-Markers selten mit einer Erhöhung des CD107-Markers verknüpft (Tab.10).

### 3.2.5.3.1 MT-und CD107-Erhöpfung → LC3-Erhöpfung

Zu den Messungen im Kapitel 3.2.5.3 (Tab. 10), die eine gleichzeitige Erhöhung des MT-Markers und des CD107-Markers zeigten, wurde in Tabelle 11 zusätzlich der LC3-Marker untersucht. Mit dem LC3-Marker wird untersucht, ob der Abbau der Mitochondrien durch Autophagie stattfindet.

Es wurde bei 2/3 der Messungen mit MT- und CD107-Erhöpfung auch eine LC3-Erhöpfung beobachtet (Abb. 10).

Tab. 11: Autophagie der Mitochondrien. MT: MitoTracker, CD: Cluster of Differentiation, LC3: light chain 3, OP: Operation.

Patientengruppe	Bei MT- und CD107-Erhöpfung auch LC3 erhöht bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten LC3-Werten bei MT- und CD107-Erhöpfung
Alle Post OP-Patienten	5	8	63
Post OP (Notfall)	4	7	57
Post OP (mit Polytrauma)	1	1	100
Prae mortem	7	11	64

Es sind nicht alle Messungen mit erhöhten MT- und CD107-Werten aus der Tab. 10 in Tab. 11 enthalten. Bei der Post OP-Gruppe sind bei 4 Messungen und bei der Prae mortem-Gruppe bei 5 Messungen keine LC3-Werte vorhanden.

### 3.2.5.3.2 *Zusammenhang der MT- und CD107-Erhöhung mit dem Granulozytenwinkel*

Für die folgende Untersuchung wurden die Messungen mit einem gleichzeitig erhöhten MT-, CD107- und LC3-Wert aus der Tab.11 des vorherigen Kapitels untersucht.

Unter Einbezug des Granulozytenwinkels wird der Abbauvorgang untersucht. Der Granulozytenwinkel wurde im Scatter plot der Patientenproben gemessen. Er entsteht durch die Verteilung der Granulozyten im Schaubild. Bei der Autophagie werden die Zellen durch Abgabe ihres Inhaltes zum Abbau kleiner und durch Bildung von Vesikeln auf der Membran granulierter. Das zeigt sich im Schaubild in einem erhöhten Side-Scatter-Wert auf der Y-Achse und einen erniedrigten Forward-Scatter-Wert auf der X-Achse. Dies zeigt eine Verschiebung der Zellen nach „oben“ und „links“ im Schaubild, sodass der gemessene Winkel im Vergleich zur Kontrollgruppe größer ist.

Bei den Post OP-Patienten wurde keine Erhöhung des Winkels beobachtet (Tab. 12a).

Tab. 12a: Untersuchung des Mitochondrienabbaus, Maß dafür ist ein erhöhter MT-Wert mit einhergehende CD107-Erhöhung, mit dem LC3-Marker und Granulozytenwinkel. MT: MitoTracker, CD: Cluster of Differentiation, LC3: light chain 3, OP: Operation.

Patientengruppe	<b>Winkel- Erniedrigung bei</b>	<b>Winkel normal bei</b>	Winkel- Erhöhung bei	Von insgesamt... Patienten
Alle Post OP- Patienten	3	2	0	5
Post OP (Notfall)	2	2	0	4
Post OP (mit Polytrauma)	1	0	0	1
Prae mortem	1	2	2	5

Bei der Post OP-Gruppe zeigt keiner der Fälle eine Erhöhung des Winkels. Von der Prae mortem-Gruppe zeigen 2 von 5 Fällen eine Erhöhung des Winkels. Bei den Patienten der Prae mortem-Gruppe findet auch Apoptose statt (Tab. 12a).

Die folgende Untersuchung betrifft die Patienten mit gleichzeitig erhöhten MT- und CD107-Werten aus Tab. 10.

Bei keiner Messung wurde eine Erniedrigung beobachtet (Tab. 12b).

Tab. 12b: Untersuchung des Mitochondrienabbaus, Maß dafür ist ein erhöhter MT-Wert mit einhergehender CD107-Erhöhung, mit dem LC3-Marker und Granulozytenwinkel. MT: MitoTracker, CD: Cluster of Differentiation, LC3: light chain 3, OP: Operation.

Patientengruppe	Winkel- Erniedrigung bei	<b>Winkel normal bei</b>	<b>Winkel- Erhöhung bei</b>	Von insgesamt... Patienten
Alle Post OP- Patienten	0	1	1	2
Post OP (Notfall)	0	1	1	2
Post OP (mit Polytrauma)	0	0	0	0
Prae mortem	0	1	2	3

Keine der Messungen zeigt eine Erniedrigung des Granulozytenwinkels.

### ***3.2.5.3.3 Abbau der Mitochondrien***

Im Kapitel 3.2.5.3 wurde untersucht, ob eine erhöhte Mitochondrienanzahl (MitoTracker-Erhöhung) durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies den Abbau (CD107-Erhöhung) in den Zellen erhöht.

Bei etwas mehr als 2/3 der gesamten Messungen ist der MT-Wert bei einer CD107-Erhöhung erniedrigt (Tab. 13).

Tab. 13: Abbau der Mitochondrien mittel der CD107 und MT Marker. CD: Cluster of Differentiation, MT: MitoTracker, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erhöhung führt zu einer MT-Erniedrigung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erniedrigten MT-Werten bei CD107-Erhöhung
Alle Post OP-Patienten	18	30	60
Post OP (Notfall)	1	12	8
Post OP (mit Polytrauma)	17	18	94
Prae mortem	1	17	6

Sowohl bei der Notfall OP-Gruppe, als auch bei der Prae mortem-Gruppe zeigte sich ein erhöhter Nachweis von Abbauvorgängen durch den CD107-Marker (Kapitel 3.2.3), aber keine Abnahme der Mitochondrienanzahl.

Tab. 14: Mitochondrienanzahl bei Erniedrigtem Abbau mittels CD107- und MT-Marker. CD: Cluster of Differentiation, MT: MitoTracker, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erniedrigung und MT-Erhöhung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten MT-Werten bei CD107-Erniedrigung
Alle Post OP-Patienten	11	11	100
Post OP (Notfall)	6	6	100
Post OP (mit Polytrauma)	5	5	100
Prae mortem	5	5	100

### 3.2.5.4 Apoptose gemessen anhand einer Granulozytenwinkelerhöhung

Eine CD107-Erhöhung ohne eine Erhöhung des LC3-Markers würde für den Abbau u.a. über den Vorgang der Apoptose sprechen.

Eine Erhöhung des CD107-Markers bedeutet einen gesteigerten Abbau in den Zellen eines Organismus. Die gleichzeitige Erhöhung des LC3-Wertes deutet auf den Vorgang der Autophagie hin. Abbau findet auch über andere Abbauvorgänge statt. Mit dem Granulozytenwinkel kann untersucht werden, ob der stattfindende Abbau über Apoptose erfolgt, da ein erhöhter Granulozytenwinkel ein Zeichen für das Stattfinden der Apoptose ist.

Eine CD107-Erhöhung mit gleichzeitig erniedrigten, oder sich im Normbereich befindenden LC3-Werten spricht für einen anderen Abbauvorgang. Das Vorkommen anderer Abbauvorgänge als Autophagie wurde bei 1/3 der Messungen beobachtet (Tab.15).

Tab. 15: Stattfinden anderer Abbauvorgänge bei erniedrigter Autophagie mittels LC3- und CD107-Marker. LC3: light chain 3, CD: Cluster of Differentiation, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erhöhung und normaler/erniedrigter LC3-Wert bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten CD107- Werten bei normalen/erniedrig- ten LC3-Wert
Alle Post OP- Patienten	10	26	38
Post OP (Notfall)	3	8	38
Post OP (mit Polytrauma)	7	18	39
Prae mortem	6	16	38

In Tab. 15 wird gezeigt, dass auch andere Abbauvorgänge in den Zellen stattfinden. Die folgende Untersuchung betrifft die Patienten mit einer CD107-Erhöhung und einem LC3-Wert im Normbereich oder im erniedrigten Bereich.

Ein Abbau durch den Vorgang der Apoptose geht mit erhöhtem Granulozytenwinkel einher. Bei mehr als 2/3 der Messungen wurde ein erhöhter Winkel beobachtet (Tab. 16).

Tab. 16: Der Granulozytenwinkel (GW) in Abhängigkeit von den CD107- und LC3-Markern. CD: Cluster of Differentiation, LC3: light chain 3, OP: Operation.

Patientengruppe	GW-Erhöhung bei CD107-Erhöhung und normalen/erniedrigten LC3-Wert bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhtem GW bei erhöhtem CD107-Wert und normalem/erniedrigtem LC3-Wert
Alle Post OP-Patienten	6	8	75
Post OP (Notfall)	1	2	50
Post OP (mit Polytrauma)	5	6	83
Prae mortem	3	5	60

Es sind nicht alle Messpaare mit einer CD107-Erhöhung und nicht erhöhten LC3-Wert aus der Tab. 15 in der Tab. 16 enthalten, da bei einzelnen Fällen ein Granulozytenwinkel nicht gemessen wurde. Beim Vorkommen anderer Abbauvorgänge als der Autophagie zeigen die Ergebnisse mittels einer Granulozytenerhöhung das Vorkommen des Abbauvorgangs Apoptose (Tab. 16).

### **3.2.5.5 Granulozytenwinkel (als Maß für Apoptose) und LC3-Marker**

Ein erhöhter Granulozytenwinkel kommt zustande, indem die Zelle im Scatter plot eine erhöhte Granularität und ein erniedrigtes Volumen zeigt. Dies geschieht bei Zellen, die durch Apoptose untergehen.

#### ***3.2.5.5.1 Die Granulozytenwinkel in den drei Patientengruppen***

Als Überblick, wie häufig die Apoptose bei den Patienten zu beobachten war, dienen die Schaubilder Abb. 19 und Abb. 20 und die Tab. 17. Diese Tabelle zeigt die Anzahl der Patienten, die bei den verschiedenen Messzeitpunkten erhöhte Granulozytenwinkel aufwiesen. Knapp 2/3 der Patienten zeigten ein erhöhtes Stattfinden der Apoptose.

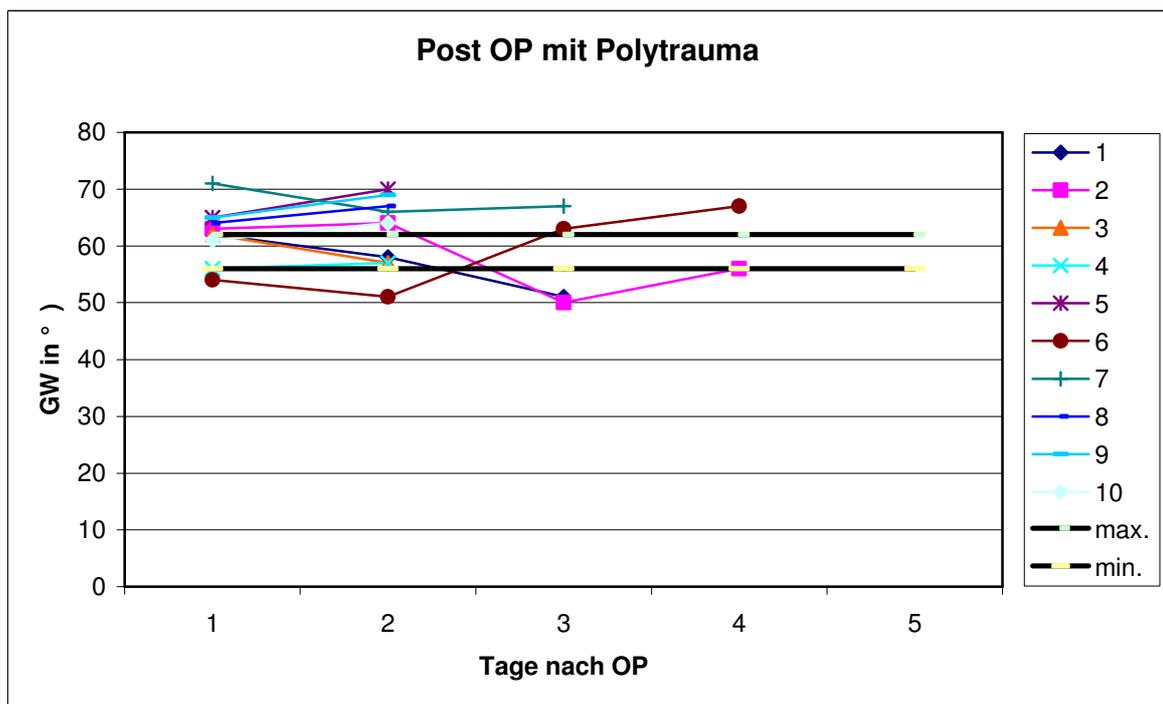
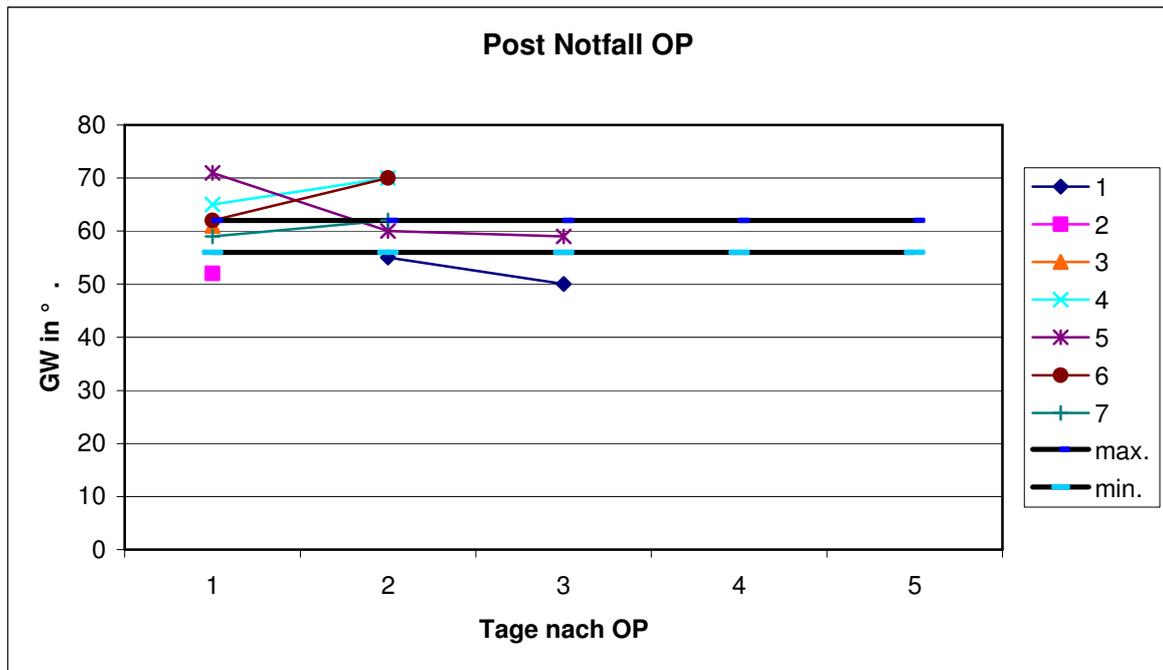


Abb. 19 Verlauf der GW-Werte der Post OP-Patienten nach OP (Tag 0). Die X-Achse gibt die Tage an, wobei Tag 1 der Tag nach der Operation ist und die weiteren Tage die darauf folgenden. Auf der Y-Achse können die GW-Werte abgelesen werden. In der Legende rechts sind mit den Ziffern die Patienten aufgelistet. Die zwei waagerechten Geraden mit der Beschriftung min. und max. zeigen den Normbereich des GW-Markers an, der in der Kontrollgruppe ermittelt wurde. OP: Operation, GW: Granulozytenwinkel, max.: Maximum, min.: Minimum, Werte in Winkelgrad °.

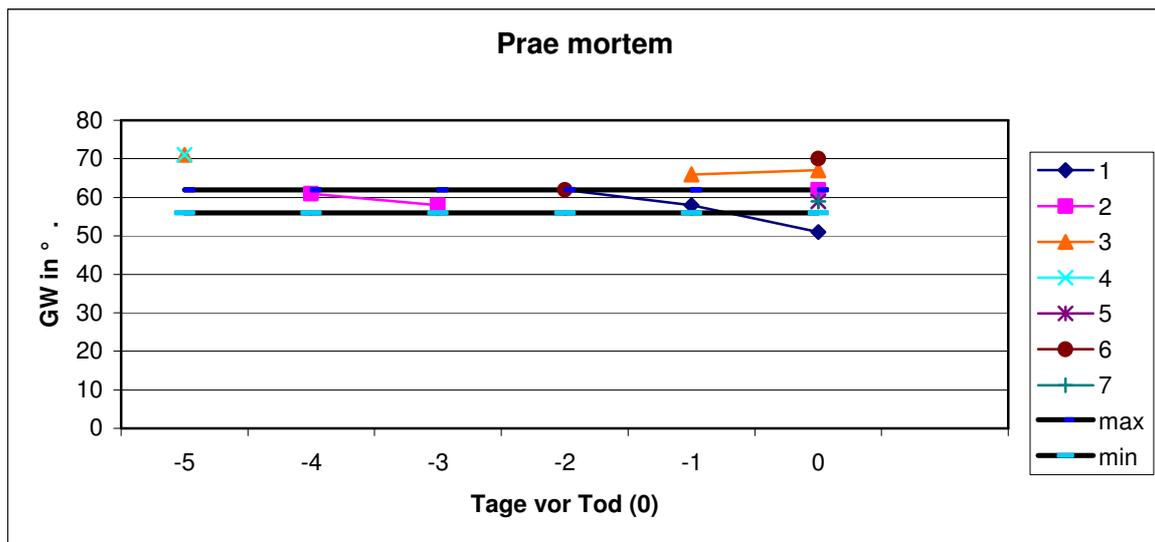


Abb. 20 Verlauf der GW-Werte der Prae mortem Patienten vor dem Tod (Tag 0). Im Schaubild sind die GW-Werte der Patienten der Prae mortem-Gruppe dargestellt. Der Tag 0 ist der Todestag der Patienten und die Tage vor ihrem Tod sind mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Die Zwei schwarzen Geraden stellen den Normbereich dar. GW: Granulozytenwinkel, max.: Maximum, min.: Minimum, Werte in Winkelgrad °.

Tab. 17: Die Granulozytenwinkel in den verschiedenen Patientengruppen. OP: Operation.

Patientengruppe	Erhöhte Granulozytenwinkel bei	Von...Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit erhöhtem Granulozytenwinkel
Alle Post OP-Patienten	10	17	59
Post OP (Notfall)	3	7	43
Post OP (mit Polytrauma)	7	10	70
Prae mortem	4	7	57

### **3.2.5.5.2 LC3-Marker und Granulozytenwinkel (als Maß für Apoptose)**

Bei dem programmierten Zelltod, die Apoptose, geht die Zelle kontrolliert unter.

Untersucht wird, ob durch das vermehrte Stattfinden der Autophagie die Zellen vor Apoptose geschützt werden. Der Granulozytenwinkel wird bei einer Erhöhung des LC3-Wertes beobachtet. Sowohl die Apoptose als auch die Autophagie finden gewissermaßen gleichzeitig im Organismus statt und sie könnten sich gegenseitig beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in dieser Untersuchung nicht die einzelnen Messungen an, sondern der Verlauf der Messungen an den verschiedenen Tagen der einzelnen Patienten ausgewertet. Das bedeutet, dass die Tendenz der LC3-Werte in den Messungen der jeweiligen Patienten beobachtet wurde und mit der Änderung des Winkels verglichen wurde.

Als Zusammenspiel des LC3-Markers und des Granulozytenwinkels wurden folgende Konstellationen untersucht:

- Eine LC3-Erhöhung mit einer Erniedrigung des Winkels als Zeichen der erniedrigten Apoptose.
- Einer LC3-Erniedrigung mit einer Erhöhung des Winkels bei einem pathologisch erhöhten Abbau gestörter Zellen, als Zeichen, dass diese durch die Apoptose abgebaut werden.

Bei 50% der Patienten wurde eine dieser beiden Konstellationen beobachtet (Tab. 18).

Tab. 18: Zusammenhang des LC3-Markers mit dem Granulozytenwinkel. LC3: light chain 3, GW: Granulozytenwinkel, OP: Operation.

Patientengruppe	GW-Erniedrigung bei LC3-Erhöhung bzw. GW-Erhöhung bei LC3-Erniedrigung bei	von...Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit Zutreffen dieses GW und LC3-Zusammenhangs
Alle Post OP-Patienten	10	17	59
Post OP (Notfall)	3	7	43
Post OP (mit Polytrauma)	7	10	70
Prae mortem	4	7	57

Von den Patienten, bei denen ein deutlicher Zusammenhang des Granulozytenwinkels mit dem LC3-Wert zu sehen war (Tab. 18), wird in Tab. 19 gezeigt, bei wie vielen eine LC3-Erniedrigung zu einer Winkelerhöhung führte.

Tab. 19: Auswirkung der LC3-Änderung auf den Granulozytenwinkel. LC3: light chain 3, GW: Granulozytenwinkel, OP: Operation.

Patientengruppe	Winkelerhöhung bei LC3-Erniedrigung bei	von...Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten mit GW-Erhöhung bei LC3-Erniedrigung
Alle Post OP-Patienten	4	10	40
Post OP (Notfall)	1	3	33
Post OP (mit Polytrauma)	3	7	43
Prae mortem	3	4	75

Ein deutlicher Zusammenhang einer LC3-Erniedrigung, die zu einer Winkelerhöhung, also Apoptose, führt, ist bei der Prae mortem-Gruppe zu beobachten. Die Patienten der Prae mortem-Gruppe, die einen Zusammenhang des Winkels und des LC3-Markers zeigt, zeigt öfters eine Winkelerhöhung in Zusammenhang mit einer LC3-Erniedrigung (Tab. 19).

Von den Patienten, bei denen ein deutlicher Zusammenhang des Granulozytenwinkels mit dem LC3-Wert zu sehen war (Tab. 18), wird in Tab. 20 gezeigt, bei wie vielen eine LC3-Erhöhung zu einer Winkelerniedrigung führte.

Tab. 20: Auswirkung der LC3-Änderung auf den Granulozytenwinkel. LC3: light chain 3, GW: Granulozytenwinkel, OP: Operation.

Patientengruppe	Winkelerniedrigung bei LC3-Erhöhung bei	von...Patienten	Prozentueller Anteil der Patienten GW-Erniedrigung bei LC3-Erhöhung
Alle Post OP-Patienten	6	10	60
Post OP (Notfall)	2	3	67
Post OP (mit Polytrauma)	4	7	57
Prae mortem	1	4	25

2/3 der Post OP-Patienten, die einen Zusammenhang des LC3-Wertes und des Winkels zeigten, wiesen öfter eine Winkelerniedrigung zusammen mit einer LC3-Erhöhung auf (Tab. 20).

### **3.2.5.6 CD107-Marker und Side- bzw. Forward-Scatter**

Der CD107-Marker ist ein Marker dafür, dass Abbauvorgänge in der Zelle ablaufen. Dies erfolgt durch die Degranulation der Lysosomen, also die Ausschüttung derer Inhalte. Diese Tatsache wird im Scatter plot untersucht. Dadurch, dass die Granulation bei diesem Vorgang zunimmt, werden erhöhte Side-Scatter-Werte erwartet. Außerdem wurde noch untersucht, ob die CD107-Erhöhung mit einer Forward-Scatter-Erhöhung einhergeht, was für den Abbauvorgang der Nekrose sprechen würde.

In den folgenden zwei Kapiteln werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt, um u.a. die Frage zu klären, welche Abbauvorgänge bei den Patienten mit starkem physischen und/oder psychischen Stress vorzufinden waren.

#### ***3.2.5.6.1 CD107 und Side-Scatter (Maß für Granulation)***

Eine Erhöhung des Side-Scatters als Maß für die Granularität der Zellen weist auf eine toxische Granularität hin, die z.B. bei Patienten mit einer Sepsis vorzufinden ist.

Eine CD107-Erhöhung, als Maß für Abbau, wird bei den von uns selektierten Patienten mit einer Side-Scatter-Erhöhung erwartet.

Eine CD107-Erhöhung mit einer Side Scatter-Erhöhung wurde bei 92-100% der Patienten aller Gruppen nachgewiesen (Tab. 21).

Tab. 21: Zusammenhang einer CD107-Erhöhung mit einer Side Scatter (SSC)-Erhöhung.  
 CD: Cluster of Differentiation, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erhöhung und SSC-Erhöhung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten CD107- Werten und erhöhten SSC- Werten
Alle Post OP- Patienten	21	22	95
Post OP (Notfall)	6	6	100
Post OP (mit Polytrauma)	15	16	94
Prae mortem	11	12	92

### 3.2.5.6.2 CD107 und Forward-Scatter (als Maß für Nekrose und NETose)

Der Forward-Scatter zeigt die Größe der Zelle an. Nimmt dieser Wert bei einer gleichzeitigen CD107-Erhöhung zu, so kann man daraus schließen, dass vermehrt Zellen in einen nekrotischen Zustand übergehen. Die Zunahme der Zellgröße kann ein Hinweis sein, dass die Zelle an Volumen dadurch zunimmt, dass die Zellmembran an Integrität verloren hat und durchlässiger geworden ist.

Eine Erhöhung der Vorwärtstreuung ist aber auch bei dem Vorgang der NETose zu erwarten. Wenn die Zelle zur Bekämpfung von Bakterien eine fibrilläre Matrix aus Chromatin und Granula-Protein freisetzt, z.B. bei unseren Patienten mit einer Sepsis, sind auch erhöhte Forward-Scatter-Werte zu erwarten.

Das Stattfinden von Nekrose und/oder NETose wird durch die gleichzeitige Erhöhung des CD107-Markers und des Forward-Scatters gezeigt. Bei über 2/3 der Messungen wurde dies bezogen auf alle Patienten beobachtet (Tab. 22)

Tab. 22: Zusammenhang einer CD107-Erhöpfung mit einer Forward Scatter (FSC)-Erhöhung. CD: Cluster of Differentiation, OP: Operation.

Patientengruppe	CD107-Erhöpfung und FSC-Erhöpfung bei	von...Messungen	Prozentueller Anteil der Messungen mit erhöhten CD107- Werten und erhöhten FSC- Werten
Alle Post OP- Patienten	13	22	73
Post OP (Notfall)	0	6	0
Post OP (mit Polytrauma)	13	16	81
Prae mortem	10	12	83

Die Subgruppenanalyse zeigt jedoch, dass nur bei den Patienten der Gruppen Polytrauma und Prae mortem gleichzeitig zu den Vorgängen der Autophagie und Apoptose auch Nekrose und NETose stattfindet (Tab. 22).

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte geklärt werden, ob bei intensivtherapiepflichtigen Patienten mit definierten Stressfaktoren der Prozess Autophagie verstärkt nachgewiesen werden kann. Die Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle bei der Stressentstehung. Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob deren Aktivität, die anhand der Messung der Mitochondrienanzahl nur angenommen wurde, da die Aktivität nicht gemessen wurde im Stress erhöht ist und, ob diese abgebaut werden, um weiteren Stress zu vermeiden. Außerdem wurde der Abbauprozess Apoptose untersucht, sowie die Frage, ob dieser Abbau durch das Recycling der Zelle, die Autophagie, umgangen wird. Es wurde auch untersucht, ob der benötigte Marker für den Nachweis der Autophagie, der Anti-LC3-Antikörper, eine hohe Aussagekraft für das Ausmaß der Autophagie hat. Parallel zur Autophagie wurde die stattfindende Degranulation der Lysosomen als Maß für die Abbauprozesse, die u.a. während der Autophagie stattfinden, mit dem CD107-Marker untersucht, sowie die Zuverlässigkeit des Markers eine Degranulation der Lysosomen für den Vorgang Autophagie zu zeigen. Erfasst wurden Patienten in Stresssituationen, wie einem schweren Unfall mit Polytrauma, einer schweren Operation oder einer infausten Situation, die auf der Intensivstation lagen. Alle wiesen den gemeinsame Faktor Sepsis auf. Das erhöhte Auftreten der Autophagie wurde unter den genannten Stressfaktoren untersucht. Das Alter der Patienten lag zwischen 4 und 85 Jahren. Die Patienten mit einem Polytrauma waren im Schnitt jünger als die anderen Probanden der Versuchsreihe und die der Prae mortem-Gruppe älter. Die Patienten der Post Notfall OP-Gruppe hielten sich um den Median aller Patienten auf.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind der zuverlässige Nachweis der Autophagie anhand der Blutausstriche mit dem LC3-Marker und der Degranulation mit dem CD107-Marker bei Patienten mit den Stressfaktoren: Sepsis, lebensgefährdende Verletzungen, schwere Operationen und praefinal. Ein gleichzeitiger Nachweis von Autophagie mittels LC3 mit einer erhöhten Degranulation der Lysosomen, die bei der Autophagie stattfindet, anhand des CD107-Markers gemessen, konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde der hemmende Einfluss der Autophagie auf die Apoptose, die mittels des Granulozytenwinkels gemessen wurde, gezeigt. Es fanden sich Hinweise, dass der Organismus auf eine gesteigerte ROS-Bildung bei erhöhter Mitochondrienanzahl Mitochondrien abbaut, um eine weitere ROS-Bildung zu verhindern. Das konnte durch die Abnahme der Mitochondrienanzahl mit einer gleichzeitigen Erhöhung der CD107-Werte,

Marker für den Abbau, gezeigt werden.

Dadurch, dass die Zellen fixiert wurden, konnte kein Membranpotenzial mit dem MT gemessen werden, sodass die MT-Markierung in dieser Arbeit nur die Mitochondrienanzahl angibt.

#### **4.1 Diskussion der angewandten Methoden und Materialien**

Zu Beginn unserer Untersuchungen wurde über einen Zeitraum von drei Monaten das Protokoll zur Markierung der bearbeiteten Blutproben erstellt. Aus einer Blutprobe wurden mehrere Versuchsreihen mit jeweils unterschiedlichen Mengen an LC3-Marker aufgestellt. Durch den Vergleich der Ergebnisse anhand der erstellten Schaubilder, wurde die benötigte Menge an Marker ermittelt. Auch die Vorgänge: Zentrifugation und Resuspension, wurden für die Untersuchungen so gewählt, um das bestmögliche Ergebnis zu erhalten.

Eine der durchgeführten Messungen, war der Granulozytenwinkel. Es ist der Winkel der im Scatter plot Diagramm gezeigten Granulozyten zur X-Achse (siehe Kapitel 2.3.1.3 Abb. 5). Der Winkel zeigt den Zusammenhang von Größe und Granularität der Granulozyten. Die Winkelmessungen der Patienten werden mit dem Winkel der Kontrollgruppe ( $56^{\circ}$ - $62^{\circ}$ ) verglichen. Somit kann eine Aussage zum Zustand der Granulozyten getroffen werden: ein Winkel niedriger als  $56^{\circ}$  deutet auf einen nekrotischen, ein Winkel höher als  $62^{\circ}$  auf einen apoptotischen Zustand hin. Für das Abmessen des Granulozytenwinkels wurde ein Winkelmesser-Programm benutzt. Die Gerade durch die Granulozytenzellen wurde vom Anwender des Programms selbst gesetzt. Somit konnte es in diesem Fall zu Abweichungen kommen. Diese Messung wurde nur von mir selbst durchgeführt. Die häufige Anwendung durch eine untersuchende Person gewährleisten geringstmögliche Abweichungen.

Die Blutausstriche erfolgten zum Nachweis von Autophagie. Die Anfertigung erfolgte mit einem Gerät in der Abteilung der klinischen Chemie, sodass in diesem Schritt Untersucher-abhängige Fehler vermieden werden konnten. Die Untersuchung der Blutausstriche unter dem Mikroskop und das Zählen von Autophagie betreibenden Zellen erfolgten manuell. Durch mehrmalige Kontrollen von Frau Prof. Dr. EM Schneider wurde das Erkennen des Prozesses Autophagie durch drei Doktoranden erlernt. Das Untersuchen der Blutausstriche unter dem Mikroskop erfolgte nur durch diese drei Doktoranden. Somit unterlag diese Untersuchung geringen Schwankungen.

Die Kontrollgruppe bestand aus jungen Laborpraktikanten und Angestellten im Alter zwischen ca. 17 und 30 Jahren. Aus diesen Werten wurde der Median für jeden Marker ausgerechnet und ein Bereich, die Standardabweichung, in dem sich die Probanden der Kontrollgruppe aufhielten, angegeben. Ausreißer wurden aus der Wertung genommen, wenn Nachkontrollen diese Werte nicht bestätigten, oder wenn es erklärende Gründe für solche Ausreißer, wie z.B. Sport am Vortag, aktive Allergien, psychischer Stress, gab.

## **4.2 Fragestellungen**

### **4.2.1 Ist eine erhöhte Autophagie bei Patienten in Stresssituationen im Vergleich zur Kontrollgruppe mittels LC3 nachweisbar?**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit des erhöhten Auftretens des Prozesses der Autophagie im Vergleich zur Kontrollgruppe, mittels des Autophagiemarkers LC3 untersucht. Der LC3-Marker bindet Autophagosomen. Mit dem Anti-LC3-Antikörper als Autophagie-Marker wurden in der Durchflusszytometrie die Patienten mit den oben genannten Stressfaktoren untersucht. 80 Prozent der Patienten wiesen eine Erhöhung des LC3 Autophagiemarkers auf (siehe Tab.5). Die 20 Prozent der Patienten, die keine LC3 Autophagiemarkererhöhung aufwiesen, waren u.a. drei sehr junge Patienten (18, 30 und 38 Jahre alt).

Die Ergebnisse erfolgten aus den Messdaten der FACS-Analyse. Aus diesen Messdaten wurde die Anzahl der markierten Zellen entnommen. Das bedeutet, dass bei den Patienten, die höhere LC3-Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufwiesen, mehrere Zellen von diesem Vorgang betroffen waren. Dieser Organismus betreibt diesen Prozess also im höheren Maße, als die Probanden der Kontrollgruppe.

In publizierten Arbeiten [22; 40; 41] wird der Prozess Autophagie als ein physiologischer Abbauprozess von beschädigten Organellen, wie z.B.: Mitochondrien beschrieben, sowie als ein Prozess, der zur Bereitstellung von Nährstoffen bei Malnutrition dient. Somit wirkt

die Autophagie wie ein Überlebensmechanismus des menschlichen Organismus. Hinzu kommt, dass dieser Prozess auch bei der Bekämpfung von Erregern beteiligt ist [22].

Zudem ist die Autophagie ein spezifischer Abbauprozess von Organellen. Es wurden spezifische Rezeptoren, die LC3-Rezeptoren, entdeckt, die für einen selektiven Abbau sorgen. Somit ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung des LC3-Markers für das tatsächliche Vorkommen der Autophagie steht [40].

Die Autophagie ist ein Abbauprozess, der in bestimmten Stresssituationen, wie Aminosäurenmangel, erhöhter Umsatz von Organellen und Proteinen, im Alter oder bei Infektionen verstärkt stattfindet [41].

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass bei ca. 80% der selektierten Patienten auf der Intensivstation anhand des LC3 Markers der Abbauprozess Autophagie im erhöhten Maß aufgewiesen wurde. Der prozentuale Unterschied von 16% zwischen der Post Notfall OP-Gruppe mit 70% und der Prae mortem-Gruppe sowie der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma mit jeweils 86% könnte am Altersunterschied liegen und dem damit verbundenen stärkeren oxidativen Stress im hohen Alter. Die Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma zeigte ein Durchschnittsalter von 26 Jahren (drei der Patienten dieser Gruppe ohne erhöhte Autophagie waren unter 40 Jahre alt). Tatsächlich waren alle Patienten, die keine erhöhte Autophagie zeigten, unter 50 Jahre alt. Auch mit dem hohen Alter können die Ergebnisse der Prae mortem-Gruppe verbunden werden. Die Ergebnisse sprechen in diesem Fall dafür, dass die älteren Patienten eine erhöhte Autophagie aufweisen.

Hinzu kommt in dieser Gruppe auch der Faktor, dass der Körper die Situation nicht bewältigen kann und dies zum Tod der Patienten führt. Fünf von sechs Patienten zeigten eine erhöhte Autophagie, jedoch nahe dem Normbereich. Das könnte damit zusammenhängen, dass der Organismus bei einer infausten Situation vermehrt den Vorgang der Nekrose betreibt. Der Unterschied zur Autophagie ist in diesem Prozess, dass der Organismus die Substanzen der abgebauten Moleküle nicht wiederverwerten kann. Die Nekrose bedeutet einen Untergang der betroffenen Moleküle und Organellen. Im hohen Alter ist ein erhöhter oxidativer Stress zu erwarten, da die Mitochondrienfunktion mit Zunahme des Alters anfälliger für Dysfunktionen werden und umgekehrt die Mitochondriendysfunktion über oxidativem Stress das Altern bewirkt [24; 35]. Dies wird ausführlich in Kapitel 4.2.4. diskutiert.

Annähernd alle Patienten in den beschriebenen Stresssituationen wiesen zusammenfassend anhand des LC3 Markers eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Autophagie auf.

#### **4.2.2 Kann Autophagie über Nachweis von LC-3 in Blutzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgen?**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zuverlässigkeit des LC3-Markers für den Prozess der Autophagie geprüft werden. Somit musste geklärt werden, ob die erhöhten Messwerte in der FACS-Analyse einem erhöhten Nachweis an Autophagie entsprechen. Es könnten nämlich auch Bindungen des Antikörpers an andere Proteine gemessen worden sein. Außerdem bindet der LC3-Marker sowohl an das LC3 I Protein, als auch an das LC3 II Protein. Nur das LC3 II Protein ist an der Membran des Autophagosoms gebunden, daher könnte durch das Binden des Markers an dem sich frei im Zellplasma befindendem Protein LC3 I für falsch hohe Werte sorgen.

Um dies zu untersuchen wurden von den Blutproben, aus denen die FACS-Analysen erfolgten, auch Blutausstriche angefertigt. Somit konnte mit dem Mikroskop der Prozess der Autophagie in den Granulozyten nachgewiesen werden. Es war zu beobachten, dass bei erhöhten LC3-Messwerten auch vermehrt Autophagie in den Zellen zu finden war. Diese Untersuchung erfolgte während der Bearbeitung des Protokolls bei etwa 30 Proben. Nachdem der Zusammenhang zwischen erhöhten LC3-Werten und unter dem Lichtmikroskop sichtbar erhöhten Autophagie ausreichend beobachtet wurde, erfolgten keine weiteren Blutausstriche mehr. Eine Autophagie konnte mit hoher Sicherheit unter dem Mikroskop nachgewiesen werden.

Auch andere Arbeiten [41] zeigen, dass der LC3-Marker ein zuverlässiger Marker für den Prozess Autophagie ist. Außerdem ist das LC3-Protein ausschließlich in der Autophagosomenbildung in der Autophagie beteiligt. Somit ist der Antikörper gegen das LC3-Protein auch ein sehr spezifischer Marker. In der angesprochenen Studie [41] wurde der LC3-Marker auch mit dem Verfahren FACS detektiert. Es wurde der Vergleich zwischen Zellen in aminosäurereichem Medium und Zellen in aminosäurearmem Medium erbracht. So konnte ein Vergleich zwischen einem Nährstoffreichem Medium und einer Malnutrition, die einen sehr wichtigen Stressfaktor für die Autophagie darstellt, erstellt werden. Dabei wurde im Verlauf das Vorkommen vom LC3-Protein gemessen. Im aminosäurearmen Medium war ein erhöhtes Vorkommen von LC3 zu beobachten. Somit findet der Abbauprozess Autophagie bei Aminosäuremangel im erhöhten Maß statt [41].

Folglich kann aus der vorliegenden Arbeit und der Studie [41] geschlossen werden, dass mittels LC3-Marker per FACS-Analyse Autophagie erfasst werden kann. Der LC3-Marker erwies sich als ein zuverlässiger Marker für den Prozess Autophagie. Das LC3-Protein ist ein sehr spezifisches Protein des Autophagosoms und wird zuverlässig detektiert.

#### **4.2.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen LC3 und CD107?**

Die Hypothese lautet, dass die Autophagie, mittels LC3 gemessen, mit einer Lysosomendegranulation, mittels CD107 gemessen, einhergeht.

Der Prozess Autophagie beinhaltet die Autophagosombildung und die Fusion und gleichzeitige Degranulation der Lysosomen. Dies bedeutet, dass in diesem Fall eine Markierung der betroffenen Zellen sowohl mit dem LC3-Marker als auch mit dem CD107-Marker, der das Oberflächenmolekül CD107 bindet, das bei Degranulation von Lysosomen exprimiert wird, zu beobachten sein sollte. Eine zusätzliche CD107-Marker-Erhöhung ist zu erwarten, da diese für einen Abbau von Zellen jeglicher Art spricht [18].

Die Patienten, die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte CD107-Werte aufwiesen, waren mit 60 bis 86 Prozent aller Patienten ähnlich viele, wie die, die erhöhte LC3-Werte aufwiesen (siehe Tab.5 und Tab.6). Entscheidend für die Hypothese ist der Vergleich der LC3- und CD107-Werte bei den einzelnen Patienten. Es zeigten nicht alle Patienten, die Autophagie, mittels LC3 gemessen, im erhöhten Maß aufwiesen auch erhöhte CD107-Werte. Dies wäre nämlich zu erwarten, da eine vermehrt betriebene Autophagie auch für vermehrt Degranulation der Lysosomen sprechen würde. Aus allen Messungen zeigten 60 bis 86 Prozent eine gleichzeitige Erhöhung beider Marker (siehe Tab.8). Den geringsten prozentualen Anteil an Patienten mit einem nicht erhöhten Abbau, anhand des CD107-Markers gemessen, bei gleichzeitig erhöhter Autophagieaktivität, anhand des LC3 Markers gemessen, zeigte die Post Notfall OP-Gruppe. Das könnte bedeuten, dass die anderen Abbauvorgänge wie die Apoptose und Nekrose, die auch mit einer Degranulation einhergehen, generell erniedrigt waren. Also würde ein Patient, mit erhöhter Apoptose oder Nekrose, aber einer niedrigen Autophagieaktivität, ähnlich hohe CD107-Werte zeigen, wie ein Patient mit niedrigerem Abbau durch Apoptose oder Nekrose, aber dafür stark erhöhter Autophagieaktivität. Eine Lysosomendegranulation findet nämlich nicht nur bei der Autophagie statt, sondern auch bei anderen Abbauvorgängen im menschlichen Organismus, wie Apoptose oder Nekrose, und somit bewirken auch diese Vorgänge eine

Erhöhung des CD107-Markers. Der GW zeigt die Ausrichtung der Granulozyten in den zwei Ebenen, welche die Granulation in der Y-Achse und die Zellgröße in der X-Achse eines Scatter plot Diagramms wären, zur Waagerechten gemessen. Von diesen zwei Streuungen lässt sich abschätzen, welcher Abbauvorgang überwiegt. Ist überwiegend Apoptose der betriebene Abbauvorgang, so überwiegt die Streuung in die Y-Achse, sodass ein höherer Winkel gemessen wird. Ein kleinerer Winkel spricht für das Überwiegen des Vorgangs der Nekrose bzw. NETose. Somit kann für die Post Notfall OP-Gruppe die Aussage getroffen werden, dass in diesen Organismen weniger Abbau betrieben wird. Die Patienten der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma zeigten die höchsten CD107-Werte (bis ca. 160). Dies könnte wieder für eine bessere Bewältigung der Stresssituation der Patienten im jüngeren Alter sprechen. Dagegen würde aber das Ergebnis der Patienten der Prae mortem-Gruppe mit vergleichbar erhöhten Granulozytenwinkelwerten sprechen, die zwar nicht stark erhöhte Werte aufwiesen, aber bei allen Patienten eine Erhöhung zu beobachten war.

Es herrschte nicht immer eine Übereinstimmung der LC3- und CD107-Werte, da der Abbau der betroffenen Zellen und Zellbestandteile womöglich durch andere Abbauvorgänge vermindert betrieben wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe, sodass der CD107-Wert insgesamt im erniedrigten bzw. normalen Bereich lag, obwohl verstärkt Zellen Autophagie, anhand des LC3 Markers gemessen, betrieben.

Es wurde keine vergleichbare Arbeit, die einen Zusammenhang des LC3-Markers und des CD107-Markers untersucht, gefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bisher gezeigt, dass der LC3-Marker ein zuverlässiger Marker der Autophagie ist. In Studien ist gezeigt, dass der CD107-Marker ein zuverlässiger Marker der Degranulation von Lysosomen ist [19].

Die Degranulation ist ein Zeichen für viele Abbauprozesse, wie die Autophagie, Apoptose, oder Nekrose. Somit ist nicht immer mit vergleichbar hohen CD107-Werten bei bestimmten LC3-Marker-Erhöhungen zu rechnen. Ein Patient könnte einen erhöhten LC3-Nachweis aufweisen, aber möglicherweise bei geringen parallel verlaufenden anderen Abbauprozessen, noch einen normalen CD107-Wert haben. Dies kann damit zusammenhängen, dass der CD107-Marker für alle Abbauvorgänge als Nachweis dient. Somit kann eine erhöhte Autophagie nachgewiesen werden, bei der aber der CD107-Marker im Normbereich ist, weil sonst kein gesteigerter andersartiger Abbau der Zellen

stattfindet. Daher ist die Degranulationserhöhung durch die Autophagie allein nicht ausreichend, einen erhöhten CD107-Wert im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die verschiedene Abbauvorgänge im Physiologischen parallel betreibt, zu bewirken.

Zusammenfassend kann mit der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass eine erhöhte Autophagie im Organismus zwingend mit einer Erhöhung des Degranulationsmarkers einhergehen muss, nicht ausreichend bestätigt werden.

#### **4.2.4 Besteht ein Zusammenhang zwischen LC3 und der Anzahl nachweisbarer Mitochondrien?**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Mitochondrien-Marker, MitoTracker, die Anzahl der Mitochondrien gemessen. Der MitoTracker wird zur Markierung von Mitochondrien eingesetzt. Aus der Information Mitochondrienanzahl, die uns dieser Marker angibt, kann auf eine gesteigerte Mitochondrienaktivität nur spekuliert werden, da die gemessenen Mitochondrien auch nicht mehr funktionsfähig sein könnten. Die von den Mitochondrien produzierten ROS können bei unzureichender Reduktion dem Organismus Schäden hinzufügen. Es werden entweder durch eine Fehlfunktion der Mitochondrien vermehrt ROS gebildet, oder es besteht ein Mangel an Reduktionsmechanismen bei normaler ROS-Bildung [30].

Die Ergebnisse der jeweiligen Gruppen zeigten große Unterschiede. Von den Post OP Patienten mit Polytrauma zeigten nur 30% eine erhöhte Anzahl von Zellen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Mitochondrienanzahl aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten alle Patienten der Notfall Post OP-Gruppe und Prae mortem Gruppe erhöhte MT-Werte, wobei sich die Werte der Prae mortem-Gruppe nahe dem Normbereich befanden. Womöglich könnte das mit dem niedrigeren Durchschnittsalter der Patienten der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma zusammenhängen. Das würde dafür sprechen, dass der Organismus junger Menschen im Vergleich zu den älteren Patienten der Post Notfall OP-Gruppe besser in der Lage ist, den durch ROS bewirkten oxidativen Stress zu bewältigen. So wäre dies bei den jungen Patienten als ein Schutzmechanismus vor oxidativem Stress anzusehen.

Der große Unterschied der Mitochondrienanzahl zwischen den Patienten mit einem Polytrauma, von denen nur 30% erhöhte MT-Werte zeigten, und denen der anderen zwei Gruppen, mit 100% erhöhten Werten, könnte ein Hinweis auf eine größere Stresssituation der zwei letzteren Gruppen sein, die zu bewältigen ist und dafür womöglich enorm viel Energie benötigt wird. Dies würde die erhöhte Mitochondrienanzahl erklären. Die Patienten mit einem Polytrauma wurden auch operiert und dennoch weisen nur 30% der Patienten erhöhte MT-Werte auf. Das könnte wieder ein Hinweis darauf sein, dass sie dadurch, dass sie ein geringeres Lebensalter haben den Stress besser bewältigen, als die älteren Patienten der Post Notfall OP-Gruppe.

Es wurde auch die Auswirkung einer erhöhten Anzahl aktiver Mitochondrien auf den Abbau jeglicher Art untersucht. Es ist bekannt, dass oxidativer Stress zu erhöhten Abbauprozessen führt. Der oxidative Stress wurde in der vorliegenden Arbeit nicht mit einem bestimmten Marker ermittelt. Bei den Messungen, die eine Erhöhung des MT-Wertes zeigten, wurde je nach Gruppen zwischen 17 und 76 Prozent eine gleichzeitige CD107-Erhöhung beobachtet. Nur 17% der Messungen der Patienten der Post OP Gruppe mit Polytrauma zeigten diesen Zusammenhang, wobei die Fallzahl gering war (siehe Tab. 10). Bei den Polytrauma-Patienten waren die MitoTrackermessungen sehr niedrig gewesen (siehe: Kapitel 3.2.4). Dies könnte dazu geführt haben, dass bei den Polytrauma-Patienten eine Erhöhung des MT-Markers selten mit einer Erhöhung des CD107-Markers einherging. Nimmt man an, dass die MT-Erhöhung zu einer ROS-Erhöhung und somit zu einer Erhöhung der Zellschäden führt, würde diese Beobachtung für eine vorwiegend ungestörte Mitochondrienfunktion oder für eine ausreichende Reduktion der ROS bei den Patienten der Post OP mit Polytrauma-Gruppe sprechen.

Bei etwa 60% der Patienten mit erhöhten CD107- und MT-Werten ist eine gleichzeitige LC3-Erhöhung zu beobachten, woraus man durch den erhöhten LC3-Wert auf den Abbauvorgang Autophagie schließen kann (siehe Tab.11). Am deutlichsten ist dies bei der Polytrauma-Gruppe zu sehen. Bei den Patienten mit erhöhten MT- und CD107-Werten, die gleichzeitig einen niedrigen LC3-Wert zeigten, wurde eine Erhöhung des Granulozytenwinkels erwartet, was für eine Apoptose spricht. Die Hypothese lautet, dass die Patienten ohne erhöhte LC3-Werte keine erhöhte Autophagie betreiben. Der mittels CD107 nachgewiesene Abbau läuft dann vorwiegend über die Apoptose ab. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig und die Fallzahl sehr gering, sodass keine Schlüsse gezogen werden dürfen.

Außerdem wird diskutiert, ob beim betriebenen Abbau, Autophagie und auch Apoptose, bevorzugt Mitochondrien betroffen sind, um weiteren oxidativen Stress zu vermeiden (siehe Kapitel 4.2.6). Schwer zu erklären ist, ob der oxidative Stress zur Autophagie der Mitochondrien führt, um eine weitere Bildung von ROS zu vermeiden, da gleichzeitig diskutiert wird, ob die erhöhte Mitochondrienaktivität zwangsläufig zur ROS-Bildung führt. Man kann also mit den gleichen Wertepaaren, den Zusammenhang von LC3- und MT-Werten, in zwei Weisen diskutieren. Die LC3-Erhöhung bei erhöhten MT-Werten und die MT-Erniedrigung bei einer LC3-Erhöhung. Dies würde bedeuten, dass die erhöhte Mitochondrienanzahl zum Abbau der Mitochondrien führen würde. Das klingt plausibel, kann aber schwer mit den Wertepaaren veranschaulicht werden, da die Induktion der Autophagie durch die erhöhte Mitochondrienaktivität und die vermehrte Autophagie der Mitochondrien gleichzeitig passieren, und das Überwiegen eines dieser zwei Vorgänge mit den zwei Markern nicht zu unterscheiden sind. Somit kann keine sichere Aussage getroffen werden, ob die erhöhte Mitochondrienaktivität direkt zu einer Autophagie derselben führt.

Folgende Studien [11, 28] benutzten auch den MitoTracker zur Beurteilung der Mitochondrienaktivität. Der MitoTracker wird zur Markierung aktiver Mitochondrien eingesetzt. Auch wird ein gleichzeitiges Binden des LC3 II Markers in markierten Mitochondrien untersucht. Mit dieser Methode wurde in anderen Studien die Lokalisation der Autophagie in den Mitochondrien unter einem Mikroskop gezeigt [11].

Eine Studie benutzte diesen Marker, um aktive Mitochondrien zu markieren, um z.B. lebendige Parasiten nachzuweisen [28].

Gegen unsere Erwartungen zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht in allen Patienten der drei Gruppen erhöhte MT-Werte. Somit wiesen nicht alle eine erhöhte Mitochondrienanzahl auf. Der Marker kann bei fixierten Proben nur als Marker für die Anzahl und nicht für die Aktivität von Mitochondrien eingesetzt werden. Dies wurde sowohl in dieser Arbeit, als auch in anderen Studien gezeigt [11; 28]. Aus einer übermäßigen Erhöhung der Mitochondrienanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe kann nicht direkt auch auf ein erhöhtes Vorkommen von Abbauprozessen geschlossen werden. Die Ergebnisse waren mit Prozentwerten von 17% bei der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma und ca.70% in den anderen zwei Gruppen nicht eindeutig. Es wurde keine Erklärung für diesen Unterschied gefunden. Man kann spekulieren, dass dieser Unterschied in den MT-Werten aufgrund des Alters der Patienten vorliegt. Die jüngeren Patienten

können die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies besser bewältigen. Außerdem ist das Vorkommen von ROS im höheren Alter aufgrund der Abnahme antioxidativer Enzyme erhöht. Aus der Tabelle 11 kann nur darauf geschlossen werden, dass vorwiegend der Prozess der Autophagie gemessen mittels LC3 betrieben wurde, aber nicht, ob von dem Abbau überwiegend die Mitochondrien betroffen waren. Ob tatsächlich die erhöhte Mitochondrienanzahl für die erhöhte Autophagie verantwortlich ist und dies auch zum Abbau der Mitochondrien führt, wird in der vorliegenden Arbeit im Kapitel 4.2.6 besprochen.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann nicht erklärt werden, ob eine erhöhte Mitochondrienanzahl zu einem Abbau von Mitochondrien führt, um weitere ROS-Bildung zu vermeiden. Eine erhöhte Mitochondrienanzahl bei erniedrigtem Abbau gemessen mittels erniedrigter CD107-Werte wurde bei allen Patienten beobachtet (Tab. 14).

#### **4.2.5 Ist die Autophagie die Rettung vor der Apoptose?**

Die Unterscheidung der Abbauprozesse Autophagie und Apoptose erfolgte mit der Messung des Granulozytenwinkels. Im Vergleich zur Kontrollgruppe spricht eine Erhöhung des Winkels für Zellen, die kleiner und granulierter sind als eine normale Zelle. Das spricht wiederum für den Abbauprozess Apoptose. Bei der Nekrose oder NETose wird die Zelle nicht „portionsweise“ abgebaut, es entstehen also keine Granula und die Zelle „quillt“ auf, sodass der Side-Scatter niedriger und der Forward-Scatter höher wird. Für die Autophagie konnte mit dem Granulozytenwinkel keine Aussage getroffen werden. Es fand überwiegend Apoptose statt wenn der Winkel erhöht war und Nekrose oder NETose wenn der Winkel erniedrigt war.

Das Ergebnis der Messungen, in denen der CD107-Wert im erhöhten Bereich lag und der LC3-Wert im normalen bzw. erniedrigten Bereich, was gegen Autophagie spricht, lag bei 40%. Das spricht dafür, dass bei ca. 60 % der Messungen der erhöhte Abbau überwiegend durch den Prozess Autophagie betrieben wurde und bei den 40% durch einen anderen in dieser Untersuchung noch nicht definierten Abbauvorgang (siehe Tab.15). Bei diesen 40% der Patienten, die überwiegend einen anderen Abbauvorgang als die Autophagie aufwiesen wurden zusätzlich die Granulozytenwinkel gemessen um die Abbauvorgänge zu unterscheiden. Diese Untersuchung zeigte bei 50% der Patienten der Notfall Post OP-

Gruppe und bis zu 83% der Patienten der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma eine gleichzeitig zur CD107-Erhöhung und normwertigen bis niedrigem LC3-Wert Erhöhung des GW. Das bedeutet, dass von den 40% der Patienten, die nicht erhöht Autophagie betrieben haben (LC3 normwertig bis erniedrigt), 50% überwiegend Apoptose betrieben haben (siehe Tab.16). Dies spricht dafür, dass der Abbau vorwiegend über den Prozess Apoptose ablief. Bei der Untersuchung war die Fallzahl gering, sodass das Ergebnis durch geringste Abweichungen der einzelnen Messungen enorm beeinflusst werden konnte. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Untersuchung, bei der primär die alleinige GW-Erhöhung -ohne Berücksichtigung der LC3-Werte- der Patienten gemessen wurde (siehe Tab.17), so sieht man, dass auch hier eine GW-Erhöhung am häufigsten bei den Patienten der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma vorherrscht und am seltensten bei Patienten der Notfall Post OP-Gruppe. Bei den Patienten der Prae mortem-Gruppe wird nicht wie erwartet die am häufigsten vorkommende Apoptose beobachtet. Es könnte möglich sein, dass die Ergebnisse von einem erhöhten Vorkommen von nekrotischen Vorgängen überdeckt werden, indem der Winkel durch die vermehrt größere und weniger granulierten nekrotische Zellen wieder verkleinert wird. Bei allen Patienten mit erniedrigten LC3-Werten war keine Winkelerniedrigung zu beobachten, was für ein niedriges Vorkommen der Apoptose deuten würde. Das könnte aber womöglich keine hohe Aussagekraft enthalten, da die beiden Abbauvorgänge Apoptose und Autophagie gleichzeitig im Organismus betrieben werden können, sodass sowohl der LC3-Wert erhöht sein kann, als auch der GW, der für die Apoptose sprechen würde. Dieser Zusammenhang, dass der GW nicht erhöht ist bei einem erhöhten LC3-Wert, ist v.a. bei den jungen Patienten zu beobachten. Das würde für eine Apoptoseerniedrigung bei einer erhöhten Autophagie sprechen.

Da die Prozesse Apoptose und Autophagie auch physiologisch gleichzeitig stattfinden, wurden die Änderungen der LC3- und GW-Werte über mindestens eine bis zwei Messungen an den Folgetagen untersucht, um eine Beeinflussung beider Prozesse untereinander festzustellen. So wird im Folgenden gezeigt, wie sich der Apoptosenachweis mittels GW bei gleichzeitigem Anstieg der Autophagie und umgekehrt verhält (siehe Tab.18, 19, 20). Die Hypothese, dass eine verstärkte Autophagie die Apoptose reduziert, wurde mit dem LC3-Marker und dem GW untersucht. Steigt der Autophagieprozess an, also ist eine Erhöhung des LC3-Markers zu beobachten, sollte der GW, als Apoptosemarker, sinken und umgekehrt. Diese Übereinstimmung (LC3-Erhöhung mit GW-Erniedrigung und LC3-Erniedrigung mit GW-Erhöhung) war bei 43% der Patienten

der Post Notfall OP-Gruppe und bis zu 70% der Patienten der Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma zu beobachten. In den Tabellen 19 und 20 kann abgelesen werden, welche Situation (LC3-Erhöhung führt zu GW-Erniedrigung, oder LC3-Erniedrigung zu GW-Erhöhung) in welcher Gruppe überwiegend herrschte. Von allen Post OP Patienten ist es bei 60% eine LC3-Erhöhung, die zu einer Senkung des GW führt. Von den Prae mortem Patienten führt bei 75% der Patienten eine verstärkte Apoptose (GW-Erhöhung) zu einem gleichzeitigen Sinken der Autophagie.

Der Einfluss der Autophagie auf die Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe des LC3-Markers und des GW untersucht und angedeutet. Auch andere Studien erklären, dass es Interaktionen zwischen dem Prozess der Autophagie und der Apoptose gibt. In der folgenden Studie [29] wurde beobachtet, dass die Autophagie das p62 Protein erniedrigt, ein Protein, das in der Kaskade der Apoptose mitwirkt, sodass folglich eine Inhibition der Apoptose resultiert. Die Autophagie wurde mit dem spezifischen LC3-Marker bestimmt. Das p62 wiederum kann über die Aktivierung der mTORC1 die Autophagie inhibieren [29].

In einer weiteren Studie [9] wird die ROS-Bildung im Gehirn mit Ethanol induziert. Dadurch wird ein oxidativer Stress bewirkt. Dies bewirkt eine Aktivierung der Autophagie, gemessen am LC3-Protein, und eine Senkung des p62. Bei einer gleichzeitigen Inhibition der Autophagosomenbildung und der Fusion mit dem Lysosom durch Bafilomycin ist ein Anstieg des p62 zu beobachten. Bei einer p62-Erhöhung wurde auch der Vorgang der Mitophagie, das Abbauen der Mitochondrien, beobachtet, was eine Verminderung der Bildung von ROS bewirken würde. Tatsächlich wurde bei zusätzlicher Aktivierung der Autophagie mit Rapamycin eine verminderte Bildung von ROS beobachtet. Im Gegenteil bewirkt eine Inhibition der Autophagie mit Wortmannin oder BECN1-spezifische shRNA eine starke Zunahme der ethanolinduzierten ROS, was durch erhöhte Apoptose zu neurotoxischen Schäden führte [9].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Hemmung des Abbauprozesses Apoptose bei gleichzeitig erhöhtem Stattfinden von Autophagie. Für diese Untersuchung war die Fallzahl der vorliegenden Arbeit sehr niedrig, sodass man die Ergebnisse nicht überbewerten sollte. Betrachtet man aber auch andere Studien [9; 29], kann man davon ausgehen, dass dieses Ergebnis trotz niedriger Fallzahl den anderen Arbeiten entspricht.

Die Folgen der Apoptose-Hemmung durch die Autophagie für den Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Je nach Situation des Patienten und die Art bzw. den Schweregrad seiner Erkrankung könnten die unterschiedlichen Abbauprozesse von Vorteil sein, oder dem Patienten Schaden anrichten. Ein Beispiel wäre, dass die erhöhte Apoptose aufgrund von Zellschädigungen bei Entzündungsreaktionen wie z.B. einer Sepsis mit einem Untergang von Zellen erwünscht ist. Somit wäre die Rede von einer Rettung durch die Autophagie nicht korrekt.

Im Zusammenschau der Ergebnisse vorliegender Arbeit und anderer Studien wird eine erniedrigte Apoptose bei erhöhter LC3-Markierung der Zellen beobachtet und eine erhöhte Apoptoserate bei niedrigen LC3-Werten. Also sprechen die Ergebnisse dafür, dass sich die beiden Abbauprozesse anscheinend gegenseitig beeinflussen. Dies geschieht u.a. über p62, das eine zentrale Rolle in der Signalübermittlung spielt und „den Tod oder das Überleben“ einer Zelle beeinflussen kann. Es wird viel in diesem Bereich geforscht, u.a. auch in der Tumorforschung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der angesprochenen Studien [9; 29] würden für eine Autophagie als Rettung vor der Apoptose sprechen, womöglich dadurch, dass schädigende Einflüsse minimiert und schädigende Organellen abgebaut werden.

#### **4.2.6 Werden bei Abbauprozessen Mitochondrien abgebaut, um weiteren oxidativen Stress zu vermeiden?**

Eine erhöhte Mitochondrienanzahl war bei allen Patienten der Post Notfall OP-Gruppe und Prae mortem-Gruppe nachzuweisen, aber nur bei einem Drittel der Patienten der Post OP-Gruppe mit Polytrauma (siehe Tab.7). Bei diesen drei Patienten der Polytrauma-Gruppe waren SAPS3-Score (Simplified Acute Physiology Score), der zur Klassifikation des Schweregrads der Erkrankung dient, SOFA-Score (Sequential Organ Failure Assessment Score), der eine objektive Beschreibung der Organdysfunktionen gibt, und der Schweregrad der Sepsis stärker erhöht im Vergleich zu den anderen Patienten dieser Gruppe. Auch bei den Patienten der Post Notfall OP-Gruppe konnte man eine Erhöhung der Scores bei erhöhter Mitochondrienanzahl und oxidativem Stress beobachten. Dieser Zusammenhang, war aber leider nicht immer eindeutig zu sehen, es gab auch Ausnahmen, bei denen es zu keiner wesentlichen Erhöhung der Scores kam. Bei den präfinalen

Patienten waren die Scores allgemein sehr hoch gewesen. Dies würde dafür sprechen, dass die Patienten vor dem Tod und bei Notfalloperationen den größten Stress zu bewältigen haben und dafür enorm viel Energie benötigen.

Die Patienten der Post OP Gruppe mit einem Polytrauma werden wie die Patienten der Post Notfall OP-Gruppe auch operiert. Das bedeutet, dass die Patienten dieser zwei Gruppen einen zusätzlich Stressfaktor zur Sepsis und zwar der umfangreichen Operation mit entsprechender Gewebeschädigung ausgesetzt sind. Die Patienten aus der Post OP Gruppe mit einem Polytrauma mit dem zusätzlichen Stressfaktor Polytrauma neigen jedoch zu keiner stark erhöhten Mitochondrienanzahl. Dies könnte für eine bessere Bewältigung der Situation von jungen Patienten, die der Polytrauma-Gruppe zugehören, sprechen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer erhöhten Mitochondrienanzahl auf Zellschäden mittels MitoTracker gemessen. Die von ROS verursachten Zellschäden wurden nicht durch Messungen bestätigt. Es wurde die durch ROS bewirkte Erhöhung der Abbauvorgänge untersucht. Der Tabelle 10 ist zu entnehmen, dass die erhöhte Mitochondrienanzahl bei über zwei Drittel der Patienten mit einer Erhöhung der Abbauprozesse, mittels CD107 gemessen, assoziiert ist. Die Hypothese lautete, dass die erhöhte ROS-Bildung zu Zellschäden und zu einer Erhöhung der Abbauprozesse führt. Wiederum kann untersucht werden, ob der Abbau gegen Mitochondrien gerichtet ist, um weitere ROS-Bildung zu vermindern (siehe Kapitel 4.2.4). Ausnahme waren die Patienten der Post OP-Gruppe mit Polytrauma mit nur 17% der Messungen, in denen ein erhöhter CD107-Wert bei erhöhtem MT-Wert nachzuweisen war. Zu der Fragestellung wurde untersucht, ob eine MT-Erhöhung zu einem erhöhten Abbau der Mitochondrien führt, um weiteren oxidativen Stress zu vermeiden. Fast alle Patienten der Post OP-Gruppe mit Polytrauma zeigten eine MT-Erniedrigung (Anzahl der Mitochondrien) bei einer CD107-Erhöhung (Abbauprozesse) (Tab.13). Dies könnte wieder mit dem niedrigen Durchschnittsalter der Polytrauma-Patienten zusammenhängen. Der Organismus dieser jüngeren Patienten könnte nämlich dieser extremen Stresssituation, der er unterliegt, entgegenwirken, indem er durch einen erhöhten Abbau der Mitochondrien eine weitere ROS-Bildung und damit Zellschädigung bzw. Organschädigung verhindert. Das würde auch für die niedrigere Mitochondrienanzahl dieser Patienten sprechen.

Eine bestehende erhöhte Mitochondrienanzahl bei reduzierten Abbauprozessen, wie Autophagie, Apoptose oder Nekrose, mittels CD107 gemessen, zeigten dagegen alle Patienten (Tab.14).

Dieser Schutzmechanismus, Mitochondrienabbau bei erhöhter ROS-Bildung durch Fehlfunktion von Mitochondrien oder gestörte Reduktionsmechanismen, ist auch durch folgende Arbeiten gezeigt: Eine Studie beschreibt die Mitophagie als einen wichtigen Prozess zur Prävention vor übermäßigen oxidativem Stress durch ROS-Bildung [44]. Auch die Prävention vor Schäden in der mitochondrialen DNA soll durch die gezielte Autophagie der Mitochondrien erzielt werden [31]. Auch die folgende Studie [30] zeigt, dass die erhöhte ROS-Bildung durch Interaktion mit der Autophagie diese induziert. Der genaue Vorgang ist noch nicht vollständig geklärt [30].

Zusammenfassend ist durch die genannten Studien [30; 31; 44] und der vorliegenden Arbeit, die mithilfe des MitoTrackers und des CD107-Markers die Senkung der Mitochondrienanzahl bei erhöhten Abbauprozessen, wie Autophagie und Apoptose, bei Patienten mit Stressfaktoren zeigt, erklärt, dass der Organismus die Mitochondrien abbaut, um weiter mögliche ROS-Bildung zu reduzieren.

#### **4.2.7 Besteht ein Zusammenhang zwischen dem CD107-Marker und der Zellgröße bzw. Granularität von Granulozyten?**

Über 2/3 aller Patienten zeigten erhöhte CD107-Werte. Dies spricht für einen erhöhten Ablauf von Abbauprozessen wie Autophagie, Apoptose und/oder Nekrose. Ohne weitere Differenzierung durch bestimmte Marker, wie z.B. den LC3-Marker für die Autophagie, kann bei einer CD107-Erhöhung nur allgemein über Abbauprozesse gesprochen werden. Ein Abbauprozess erfolgt durch die Degranulation der Lysosomen, also die Ausschüttung derer Inhalte. Somit müsste dies im Scatter plot auch zu beobachten sein. Dadurch, dass die Granulation bei diesem Vorgang zunimmt, würde eine Erhöhung des Side-Scatter-Wertes auf der Y-Achse der Scatter plot Schaubilder zu sehen sein. Eine erhöhte Granulation würde nämlich für eine stattgefundene Degranulation sprechen, die bei den Abbauprozessen durch das Ausschütten des Lysosomeninhalts vorkommt. Eine Erhöhung des Side-Scatters, Maß für die Granularität der Zellen, weist auf eine toxische Granularität hin, die z.B. bei Patienten mit einer Sepsis vorzufinden ist. Steigt dagegen der Forward-Scatter-Wert auf der X-Achse, ist das ein Hinweis auf eine Größenzunahme der Zelle und somit auf die Vorgänge Nekrose und NETose. Somit wären die Granulozyten durch den

niedrigen Side-Scatter und den hohen Forward-Scatter im Schaubild „rechts unten“ vorzufinden. Der Granulozytenwinkel (GW) wäre also erniedrigt.

Eine CD107-Erhöpfung, das Maß für Abbau, müsste bei den von uns selektierten Patienten mit einer Side-Scatter-Erhöpfung einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine CD107-Erhöpfung mit einer Side Scatter-Erhöpfung bei 92-100% der Patienten aller Gruppen nachgewiesen (Tab. 21).

Somit wird gezeigt, dass der CD107-Marker zuverlässig eine Degranulation anzeigt, die in dem Fall für einen intrazellulären Abbau von Zellbestandteilen spricht, sei es Eigen-, oder endozytotisch aufgenommenes Fremdmaterial.

Der Forward-Scatter zeigt die Größe der Zelle an. Nimmt dieser Wert bei einer gleichzeitigen CD107-Erhöpfung zu, so kann man daraus schließen, dass vermehrt Zellen in einen nekrotischen Zustand übergehen. Die Zunahme der Zellgröße ist nämlich ein Hinweis, dass die Zelle an Volumen zunimmt, dadurch, dass die Zellmembran an Integrität verloren hat und durchlässiger geworden ist.

Eine Erhöhung der Vorwärtstreuung ist aber auch bei dem Vorgang der NETose zu erwarten. Dadurch, dass die Zelle zur Bekämpfung der Bakterien eine fibrilläre Matrix aus Chromatin und Granula-Protein freisetzt, z.B. bei unseren Patienten mit einer Sepsis, werden auch erhöhte Forward-Scatter-Werte erwartet.

Das Stattfinden von Nekrose und/oder NETose wird durch die gleichzeitige Erhöhung des CD107-Markers und des Forward-Scatters gezeigt. Bei über 2/3 der Messungen wurde dies beobachtet (Tab. 22).

Zusammengefasst bedeuten die Ergebnisse des Side-Scatter und des Forward-Scatter, dass mittels des Side-Scatter gezeigt wird, dass der CD107-Marker sicher eine Degranulation mit Erhöhung der Granularität der Granulozyten anzeigt und anhand des Forward-Scatter, dass 2/3 der Patienten überwiegend Nekrose bzw. NETose betrieben haben.

Bei erhöhten Abbauprozessen ist bei über 80% der Patienten der Post OP-Gruppe mit Polytrauma und der Prae mortem-Gruppe eine gleichzeitige Erhöhung des Forward-Scatter zu beobachten, aber bei keinem Patient der Post Notfall OP-Gruppe (siehe Tab.22).

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den Patienten der Gruppen Polytrauma und Prae mortem, gleichzeitig zu den Vorgängen der Autophagie und Apoptose auch Nekrose und NETose stattgefunden hat (siehe Tab. 22). Somit findet die Bewältigung der starken Stresssituation dieser zwei Patientengruppen mit dem Zusammenspiel aller Abbauvorgänge statt.

Das Stattfinden der NETose würde für eine positive Reaktion des Organismus gegen eine bakterielle Infektion sprechen, da die NETose eine Unterstützung der Beseitigung der

bakteriellen Erreger ist.

Der CD107-Marker wurde auch in anderen Arbeiten als zuverlässiger Marker für die Degranulation verwendet [19; 26].

Es wurden keine Studien mit dem genannten Bezug der Information eines Scatter plot Diagramms zum CD107-Marker gefunden.

Zusammenfassend ist der CD107-Marker ein sehr zuverlässiger Marker für die Degranulation von Lysosomen. Es konnte auch in der vorliegenden Arbeit der gleichzeitige Nachweis der Degranulation mithilfe des SSC im Scatter plot bestätigt werden.

### **4.3 Schlussfolgerung**

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass unter den Stressfaktoren: Sepsis plus Polytrauma, Post-OP oder prae mortem, meistens der Prozess Autophagie im erhöhten Maß nachzuweisen ist. Die Stressfaktoren beinhalten Infektionen und die körperliche Reaktionen des Organismus auf Verletzungen der Integrität des Körpers.

Der LC3-Marker erwies sich als ein geeigneter Marker für den Nachweis von Autophagie. Dies wurde mit der Auswertung der Blutausstriche bewiesen. Er reicht also als alleiniger Marker aus, um die Autophagie nachzuweisen.

Der CD107 Marker zeigte in Kombination mit dem Granulozytenwinkel eine gute Differenzierung der Abbauprozesse. Mit erhöhten CD107-Werten und erhöhten Granulozytenwinkeln kann in Kombination mit den erniedrigten LC3-Werten zusätzlich auf eine Apoptose sicher geschlossen werden. Es zeigte sich aber aus dem Grund, dass der CD107-Marker in verschiedenen Abbauprozessen beteiligt ist, nicht immer eine Erhöhung des CD107-Markers bei einer verstärkt stattfindenden Autophagie.

Eine erhöhte Mitochondrienaktivität kann zu einer erhöhten Bildung von ROS führen, die zu einem erhöhten Abbau von Zellen bzw. Zellbestandteilen, vorwiegend über Autophagie, führen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Abbau v.a. durch die Autophagie mit einer Erniedrigung der Mitochondrienanzahl assoziiert war, möglicherweise, um einer weiteren ROS-Bildung vorzubeugen. Zudem trat bei erhöhtem Autophagienachweis mittels LC3-Marker weniger Apoptose gemessen anhand des Granulozytenwinkels auf. Autophagie könnte somit einen Schutzmechanismus vor Apoptose darstellen. Ein erhöhter Autophagienachweis könnte jedoch auch darauf hinweisen, dass die Zellschädigung nicht so ausgeprägt war und somit reversibel. Somit würde die Autophagie die Zellen vor erhöhter ROS Bildung durch die Vermeidung einer erhöhten Mitochondrienanzahl und Aktivität schützen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden klinisch experimentellen Arbeit wurden Patienten aus der Intensivstation der Anästhesiologischen Intensivmedizin im Universitätsklinikum Ulm mit einer Sepsis, schweren Sepsis oder einem Septischen Schock selektiert. Die Patientenaufnahme und die Untersuchungen erfolgten vom April 2010 sechs Monate lang bis zum September 2010. Insgesamt wurden 21 Patienten für die vorliegende Arbeit aufgenommen. Diese wurden in drei Gruppen unterteilt. Die 17 Post Operation (OP)-Patienten bildeten die zwei Post OP-Gruppen, die Post Notfall OP-Gruppe mit 7 Patienten und die Post OP-Gruppe mit einem Polytrauma mit 10 Patienten. Die dritte Gruppe war die Prae mortem-Gruppe mit 7 Patienten, unter denen auch 2 Patienten dabei waren, die vor ihrem Versterben operiert wurden. Als Kontrollgruppe zur Ermittlung von Normwerten wurden 17 junge Probanden, nach einer kurzen Anamnese über verschiedene Stresssituationen, untersucht.

In Vollblut-Proben der Patienten wurde mithilfe des Light chain 3 (LC3)-Markers bei den Patienten die Autophagie gemessen und deren Werte mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Die mit dem CD107-Marker (CD: Cluster of Differentiation) erfasste Degranulation wurde für den Abbaunachweis verwendet und der MitoTracker-Marker für die Mitochondrienanzahl.

Eine erhöhte Autophagie wiesen 80 % der Patienten auf, eine erhöhte Degranulation 71 % der Patienten und eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien auch 71 % der Patienten. Die Blutausstriche zeigten, dass der Marker LC3 zuverlässig für den Autophagienachweis ist. Mithilfe der Scatter plots wurden die Mittelwerte des side scatter bestimmt und mit diesen bestätigt, dass bei erhöhten CD107-Werten Degranulation stattfindet.

Mit einer Übereinstimmung von 74 % der Messungen war gleichzeitig Autophagie anhand LC3 und eine erhöhten Degranulation zu sehen. Dies war anhand der aufgestellten Hypothese zu erwarten, da die Lysosomendegranulation ein Schritt des Vorgangs der Autophagie ist.

Die Untersuchung des Granulozytenwinkels diente als Nachweis für die Apoptose. So wurde bei der Untersuchung des Zusammenhangs des Autophagienachweises mit dem LC3-Marker und des Apoptosenachweises mittels Granulozytenwinkel ein möglicher Weg der Rettung vor Apoptose beobachtet. Ein gleichförmiger Verlauf (Apoptoseabnahme bei Autophagiezunahme und umgekehrt) wurde bei über 60% der Messungen beobachtet. Da aufgrund der fixierten Zellen kein Membranpotenzial mit dem MitoTracker (MT)

gemessen werden konnte, konnte anhand der MitoTracker-Markierung nur die Mitochondrienanzahl erfasst werden. Damit konnte die Hypothese, ob Mitochondrien, die in erhöhter Anzahl oxidativen Stress induzieren können, bevorzugt abgebaut werden, um weiteren Stress und Abbauvorgänge zu verhindern, nicht beantwortet werden. Da die Autophagie mit gleichzeitiger Erniedrigung der Mitochondrienanzahl detektiert wurde, könnte man daraus indirekt schließen, dass möglicherweise Autophagie einer weiteren Reactive Oxygen Species (ROS)-Bildung durch Mitochondrienabbau vorbeugen könnte.

Die Bedeutung der Autophagie ist unter anderem die Baustoffwiederverwertung von funktionslosen Molekülen oder Organellen bei Patienten in starken Stresssituationen. Autophagie könnte in Stresssituationen, wie bei großen Traumata und Operationen oder Sepsis, einen Mechanismus darstellen, die Apoptose zu umgehen, welche eine Zerstörung der Zelle beziehungsweise der Organellen bedeuten würde. Weiterhin könnten möglicherweise Zellen durch Autophagie vor dem Untergang gerettet werden, indem durch den Abbau einzelner Bestandteile entstandene Baustoffe wieder verwendet werden könnten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abcam: Anti-Rabbit IgG-H&L-Antikörper  
<http://www.abcam.com/Rabbit-IgG-secondary-antibody-H-L-ab6717.html>  
(20.02.2011)
2. Abgent: LC3-Antikörper  
[http://www.abgent.com/products/AP1802b\\_LC3\\_Antibody\\_APG8B\\_C\\_term](http://www.abgent.com/products/AP1802b_LC3_Antibody_APG8B_C_term)  
(20.02.2011)
3. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB: Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma; *J Clin Invest.* 2007;117:326-336
4. Autophagic Marker LC3  
[http://www.nanotools.de/flyer/Flyer\\_LC-3.pdf](http://www.nanotools.de/flyer/Flyer_LC-3.pdf)  
(14.01.2012)
5. Balduini W, Carloni S, Buonocore G: Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury; *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 Suppl 1:30-34
6. Barth S, Glick D, Macleod K F: Autophagy: assays and artifacts; *J Pathol.* 2010; 221: 117-124
7. Beckman Coulter: CD14-Antikörper  
<http://www.labome.com/product/Beckman-Coulter/A07764.html>  
(14.04.2011)
8. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group; *Crit Care Med.* 1989;17:389-393
9. Chen G, Ke Z, Xu M, Liao M, Wang X, Qi Y, Zhang T, Frank JA, Bower KA, Shi X, Luo J: Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity; *Autophagy.* 2012;8:1577-1589
10. Choi AJ, Ryter SW: Autophagy in inflammatory diseases; *Int J Cell Biol.* 2011;2011:732798. doi: 10.1155/2011/732798
11. Chu YL, Ho CT, Chung JG, Rajasekaran R, Sheen LY: Allicin induces p53-mediated autophagy in Hep G2 human liver cancer cells; *J Agric Food Chem.* 2012;60(34):8363-8371
12. de Duve C: The lysosome turns fifty; *Nat Cell Biol* 2005; 7:847-849

13. Degranulation: LAMP 1  
[http://edoc.ub.uni-muenchen.de/7969/1/ter\\_Meer\\_Dominik.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/7969/1/ter_Meer_Dominik.pdf)  
(22.10.2011)
14. Deretic V, Klionsky DJ: How cells clean house; *Sci Am.* 2008;298:74-81
15. Deutsche Sepsis-Gesellschaft E.V.: Krankheitsbild Sepsis  
<http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Geschichte+der+Sepsis?sid=YfSkwKVezAUvnjdM0M4ajM&iid=2>  
(21.05.2012)
16. Deutsche Sepsis-Gesellschaft E.V.: Krankheitsbild Sepsis  
<http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Informationen+fuer+Mediziner?sid=Lm93vGPYqaKHrWT0jc5OxM&iid=2>  
(21.05.2012)
17. Diaclone: CD107a-Antikörper  
<http://www.gen-probe.com/product-search/product-details-new.asp?ID=81&Cat=&Keywords=cd+107&RArea=&PType=&Analyte=&Species=&Clone=&FC=&Exact=0>  
(20.02.2011)
18. eBioscience: CD107a-Antikörper  
<http://www.ebioscience.com/mouse-cd107a-antibody-alexa-fluor-488-ebio1d4b.htm>  
(12.03.2011)
19. Flesch IE, Hollett NA, Wong YC, Tschärke DC: Linear fidelity in quantification of anti-viral CD8(+) T cells; *PLoS One.* 2012;7:e39533. doi: 10.1371/journal.pone.0039533
20. Geng J, Klionsky DJ: The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series; *EMBO rep.* 2008; 9: 859-864
21. Gläsernes Labor: Blutausstrich  
[http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/SCHULLABOR/PDF/Immunologie\\_Skript\\_Oberstufe\\_neu.pdf](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/SCHULLABOR/PDF/Immunologie_Skript_Oberstufe_neu.pdf)  
(10.01.2011)
22. Glick D, Barth S, Macleod KF: Autophagy: cellular and molecular mechanisms; *J Pathol.* 2010;221:3-12

23. Hemacolor: Blutausstrich  
<http://www.pathology.unibe.ch/Lehre/downloads/Hemacolor.pdf>  
(10.01.2011)
24. Hughes AL, Gottschling DE: An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast; *Nature*. 2012. doi: 10.1038/nature11654
25. Invitrogen: MitoTracker  
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/M7512>  
(27.03.2011)
26. Jardine L, Hambleton S, Bigley V, Pagan S, Wang XN, Collin M: Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands; *Leuk Lymphoma*. 2013;54:167-173
27. Jing CH, Wang L, Liu PP, Wu C, Ruan D, Chen G: Autophagy activation is associated with neuroprotection against apoptosis via a mitochondrial pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage; *Neuroscience*. 2012;213:144-153
28. Jogdand PS, Singh SK, Christiansen M, Dziegiel MH, Singh S, Theisen M: Flow cytometric readout based on Mitotracker Red CMXRos staining of live asexual blood stage malarial parasites reliably assesses antibody dependent cellular inhibition; *Malar J*. 2012;11:235.
29. Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y: p62/SQSTM1/A170: Physiology and pathology; *Pharmacol Res*. 2012;66:457-462
30. Lee J, Giordano S, Zhang J: Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling; *Biochem J*. 2012;441:523-540
31. Lemasters JJ: Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging; *Rejuvenation Research* 2005;8:3-5
32. Mack H: Autophagie: Die Zelle isst sich selbst – doch wie funktioniert's?  
<https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/lebenswissenschaften/2009/mack-biochemie/>  
(02.11.2012)
33. Moerer O, Quintel M: Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen; *Internist* 2009;50:788-798

34. Munford RS: Sepsis und septischer Schock; In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin*, 17. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag GmbH Deutsche Ausgabe 2009, Band 2, S.2088-2096
35. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR: Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function; *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26:711-723.
36. Reggiori F, Klionsky D J: Autophagy in the Eukaryotic Cell; *Eukaryot Cell.* 2002;1:11-21
37. Remijnen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P: Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation; *Cell Res.* 2011;21:290-304
38. Sack U, Ta'rnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel, Karger, 2007, S.27–70
39. Schneider EM: (2011 persönliche Mitteilung)
40. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I: Ubiquitination and selective autophagy; *Cell Death Differ.* 2013;20:21-30 2012
41. Shvets E, Fass E, Elazar Z: Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy.* 2008;4:621-628
42. *Traumatologische Notfälle: Polytrauma*; In: Runggaldier KL (Hrsg.) *Rettungsdienst heute*, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag Elsevier GmbH München 2007, S.508
43. Wang M, Crager M, Pugazhenti S: Modulation of apoptosis pathways by oxidative stress and autophagy in  $\beta$  cells; *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:647914. doi: 10.1155/2012/647914
44. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL: Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia; *J Biol Chem.* 2008;283:10892-10903

## Danksagung

Frau Prof. Dr. rer. nat. Schneider danke ich für die Möglichkeit, meine experimentelle Doktorarbeit im Labor anzufertigen und auch für die Formulierung des Themas sowie die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und der Interpretation der Ergebnisse

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. M. Georgieff bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein herzlichster Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. M. Weiß für die Unterstützung bei der Verfassung der Arbeit und die Rekrutierung von Patienten auf der Intensivstation.

Besonders dankbar bin ich auch den Mitarbeiter/innen der Sektion Experimentelle Anästhesie insbesondere Herrn Dr. H. Hohmann für die freundliche Unterstützung im Labor.

Einen besonderen Dank auch an meinen Kommilitonen Michael Specht und Ronald Neufeld für die Unterstützung bei der Datenerfassung und Auswertung.

Auch an meine Eltern, meinen Bruder und meine Freunde herzlichen Dank für die Unterstützung und Geduld während dieser Zeit.

## **Lebenslauf**

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.