Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Georgieff

Die Bedeutung des klassischen NF-κB-Signalwegs für den Phagozytose-induzierten Zelltod von Raw 264.7-Makrophagen

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

vorgelegt von Agnes Franziska Buback
aus Karlsruhe
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Uwe Senftleben

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 26. Oktober 2007

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**

1 Einleitung **1**

1.1 Makrophagen in Immunantwort und Inflammation 1

1.2 Der NF-κB-Signalweg 2

1.3 NF-κB und Apoptose 4

1.4 Phagozytose und programmierter Zelltod 5

1.5 Zielsetzung der Arbeit 11

2 Material **12**

2.1 Chemikalien und Reagenzien 12

2.2 Lösungen 14

2.3 Antikörper 15

3 Methoden **17**

3.1 Zellkultur 17

3.2 Molekularbiologische/biochemische Verfahren 21

3.3 Statistische Verfahren 27

4 Ergebnisse **28**

4.1 Aktivität von NF-κB-Bindungsaktivität in Superrepressor- und Mock-transfizierten Raw 264.7-Makrophagen 28

4.2 Beteiligung von Proteinen stressinduzierbarer Signalwege 30

4.3 Auswirkungen der NF-κB-Suppression auf den Zelltod nach Phagozytose von E.coli 34

4.4 Unterscheidung zwischen exogenen und endogenen Mechanismen 39

4.5 Phänotypisches Aussehen von Mock- und SR-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli 41

4.6 Untersuchungen zur Art des Zelltods nach Phagozytose von E.coli 43

5 Diskussion **53**

5.1 Einleitung 53

5.2 IκBα-Superrepressors in Raw 264.7-Makrophagen 54

5.3 E.coli induzierter Zelltod 57

5.4 Biologische Bedeutung 65

6 Zusammenfassung 67

7 Literaturverzeichnis 69

Danksagung 80

Lebenslauf 81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Atg	„Autophagy related”
Bad	„Bcl-2-antagonist of cell death”
Bak	„Bcl-2-antagonist/killer”
Bax	„Bcl-2-associated-X protein”
Bcl	„B-cell leukaemia/lymphoma-related protein”
Becn1	Beclin 1
Bfl	anti-apoptotisches Bcl-2-homologes Protein (Synonym A1)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cIAP	„c-linked inhibitor of apoptosis protein”
c-Flip	„cellular FLICE (FADD-like interleukin-1β converting enzyme)-inhibitory protein”
Cl	Chlorid
CO_2	Kohlendioxid
C-terminal	Carboxyl-terminal
DABCO	1,4-Diazobizyklo-[2,2,2]-Oktan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat

EMSA	„Electro mobility shift assay“
FACS	„Fluorescens Activated Cell Sorting”
FAS	Synonym für CD 95 (Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie)
FADD	„FAS-associated via death domain”
FCS	fetales Kälberserum
Fl	Fluoreszenz
g	Gramm
g_E	Erdbeschleunigung
GAM	„Goat anti-mouse”
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	„Horse Radish Peroxidase”
IcsB	Effektorprotein von Shigella flexneri
Ig	Immunglobulin
IκB	inhibitorisches kappa B
IκBα	inhibitorisches kappa B alpha
IKK	inhibitorische kappa B-Kinase
IL	Interleukin
JB6	„Jurkat derived“-Zelllinie
JNK	c-Jun-NH_2-terminale Kinase
K	Kontrollprobe unstimulierter Zellen
kDa	Kilo-Dalton
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB-Medium	„Lysogeny broth”-Medium
LC	„Light chain”
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M.	Morbus

µ	Mikro
3-MA	3-Methyladenin
MB	„Membrane Blebs”
MDC	Monodansylcadaverin
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	„messenger RNA“
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	„Non Essential Amino Acids“
NEMO	„NF-κB-essential-Modulator“
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-P40
P	Phosphor
PAMP	„Pathogen-associated molecular patterns“
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
p-cJun	phosphoryliertes c-Jun
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
PICD	Phagozytose-induzierter Zelltod
PI	Propidiumiodid
Rel	„Relish” (Drosophilahomolog)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	„Reactive Oxygen Species”
RPA	„RNA Protection Assay”
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sip	„Salmonella invasion protein“
SR	Superrepressor
Sts	Staurosporin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Puffer-Lösung
TCL	Gesamtzelllysat
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TGF	„Transforming Growth Factor”
TNF	„Tumor Necrosis Factor”
Tris	Tris(hydroxymethol)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Einheiten
V	Vakuolen
VirG	Oberflächenprotein von Shigella flexneri
wt	Wildtyp
xIAP	„x-linked inhibitor of apoptosis protein”
YopJ	„Yersinia outer protein J”

1 Einleitung

1.1 Makrophagen in Immunantwort und Inflammation

Makrophagen haben herausragende Bedeutung für die Immunantwort im menschlichen Organismus. Sie sind wesentlicher zellulärer Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems und stellen gleichzeitig essenzielle Mediatorzellen für die spezifische adaptive Immunantwort dar.

Die Aufgaben der Makrophagen im Rahmen der Immunabwehr sind vielschichtig. Die Bindung und Phagozytose von bakteriellen, viralen oder fungiziden Pathogenen durch Makrophagen initiiert und fördert die Inflammation. Hierdurch wird eine wirksame Immunabwehr eingeleitet. Durch Ausschüttung von Zytokinen locken Makrophagen andere Immunzellen, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten, an den Ort des inflammatorischen Geschehens. Sie vermitteln gleichzeitig eine Lymphozytenaktivierung über die Produktion von Interleukinen, stellen aber auch Effektorzellen nach Aktivierung durch T-Zellen dar. Insbesondere die Prozessierung und Präsentation pathogener Antigene gegenüber T-Zellen gehören zu den wichtigsten Funktionen von Makrophagen und bilden einen unverzichtbaren Induktionsmechanismus für die adaptive Immunantwort [14,71].

Im Gegensatz hierzu haben Makrophagen aber auch anti-inflammatorische Bedeutung. Durch Produktion anti-inflammatorischer Moleküle, Induktion von Apoptose und Elimination apoptotischer inflammatorischer Zellen sind sie an der Beendigung entzündlicher Prozesse beteiligt.

Das Wissen über die pro-inflammatorischen Signalwege zu Beginn einer Entzündungsreaktion ist reichhaltig. Kenntnisse über die Mechanismen, die zur Auflösung einer Entzündung führen, sowie über die genaue Funktion der Makrophagen in diesem Zusammenhang sind zum jetzigen Zeitpunkt aber gering. Unstrittig ist jedoch, dass Makrophagen in die Beendigung einer Entzündungsreaktion involviert sind [51].

Der programmierte Zelltod als terminierender Mechanismus der Entzündung wird zunehmend erkannt und man weiß, dass viele Erkrankungen mit

Fehlregulationen des Zelltods von inflammatorischen Zellen assoziiert sind. So können Defekte in der Apoptose von Leukozyten beispielsweise die Ausbildung inflammatorischer Erkrankungen fördern [52].

Die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB an pro-inflammatorischen Mechanismen ist gut untersucht. Zahlreiche Zytokine, wie beispielsweise Interleukin-2 [39,50], Interleukin-6 [58,84] und Interferon-γ [86,87], sowie einige Akute-Phase-Proteine (z.B. Komplement Faktor B [70]) sind NF-κB-Zielgene. Die Beteiligung bei anti-inflammatorischen Prozessen, z.B. durch eine NF-κB-abhängige Regulation anti-inflammatorischer oder apoptotischer Mediatoren, ist vorstellbar, bisher allerdings nur unzureichend charakterisiert.

1.2 Der NF-κB-Signalweg

Der NF-κB-Signalweg spielt für viele Vorgänge des menschlichen Organismus auf zellulärer Ebene eine bedeutende Rolle. So kontrolliert er zum einen die inflammatorische und immunologische Antwort auf Pathogene, zum anderen ist der NF-κB-Signalweg in die Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben eingebunden. In den letzten Jahren ist er daher ein wichtiges Ziel der wissenschaftlichen Forschung im Hinblick auf die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen geworden. Durch seine prominente Rolle im Immunsystem ist NF-κB besonders als Zielstruktur für Erkrankungen interessant, die mit einer aberranten Regulation inflammatorischer Prozesse einhergehen, z.B. Sepsis und Multiorganversagen [59,62].

Die Aktivierung beispielsweise von TNFα-Rezeptoren sowie von Toll-like-Rezeptoren durch pro-inflammatorische Zytokine und „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP) führt zu einer Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes [10]. Beim klassischen NF-κB-Signalweg besteht dieser aus der IKKα- und der IKKβ-Untereinheit sowie aus der regulatorischen IKKγ-Untereinheit. Diese regulatorische IKKγ-Untereinheit wird auch als NF-κB-essential-Modulator (NEMO) bezeichnet. Dem gegenüber steht der noch nicht lange bekannte alternative Signalweg, der allein von IKKα abhängig ist [81].

Beim klassischen NF-κB-Signalweg führt die Aktivierung des IKK-Komplexes zu einer Phosphorylierung der inhibitorisch wirksamen IκBs, gefolgt von einer Polyubiquitinierung und Degradation dieser IκBs durch 26S-Proteasomen [45]. Im nicht phosphorylierten Zustand liegen IκBs an NF-κB gebunden im Zytoplasma der Zelle vor und inaktivieren so NF-κB. Zur IκB-Familie gehören IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε und Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine p105 und p100. Alle IκB-Isoformen haben eine repetitive Ankyrin-reiche Domäne, die an Rel-Homologie-Regionen bindet [28]. Die Degradation von IκBs setzt NF-κB im Zytoplasma frei und ermöglicht so die Translokation dieses nun aktivierten NF-κBs in den Kern [10]. Dort aktiviert es die Transkription responsibler Ziel-Gene, die hochaffine Bindungsmotive für NF-κB in ihren Enhancer- oder Promotorregionen besitzen (Konsensussequenz: 5'-GGGRNNYYCC-3' (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase und N = R oder Y)) [30]. Im Fall des klassischen NF-κB-Signalwegs sind dies unter anderem Gene, die in die angeborene, unspezifische Immunantwort involviert sind [10].

Säugetiere exprimieren fünf NF-κB-Transkriptions-Faktoren: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF-κB1) und p52 (NF-κB2). Die beiden letztgenannten werden als Vorläufermoleküle p105 und p100 synthetisiert und proteolytisch zu p50 (NF-κB1) bzw. p52 (NF-κB2) gespalten. Die fünf NF-κB-Proteine bilden miteinander zahlreiche Homo- und Heterodimere. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung dieser Homo- und Heterodimere werden die Transkription unterschiedlicher Zielgene und somit auch unterschiedliche biologische Funktionen reguliert. Während p50/p50- und p52/p52-Homodimere als Repressor fungieren, bewirken Dimere, die RelA oder RelB enthalten, zumeist eine Aktivierung der Transkription von Zielgenen [10]. Für den klassischen NF-κB-Signalweg ist besonders die Bildung von RelA/p50-Heterodimeren charakteristisch.

Im Gegensatz zum klassischen NF-κB-Signalweg ist der alternative IKKα-abhängige Signalweg dadurch gekennzeichnet, dass dessen Aktivierung zur Phosphorylierung des NF-κB-Vorläufermoleküls p100 führt [81]. Die C-terminale Domäne des p100 ist homolog zu den IκBs im klassischen Signalweg und hat

ebenfalls inhibitorische Funktionen. Die Degradation ist ähnlich, p100 wird nach Phosphorylierung polyubiquitiniert und anschließend durch das 26S-Proteasom zu p52 degradiert. P52 bildet vor allem mit RelB Heterodimere, die anschließend in den Kern translozieren [21].

Die klassische und die IKKα-spezifische NF-κB-Aktivierung haben zum Teil überlappende, aber auch unterschiedliche Funktionen. Während der klassische Weg für die vollständige Aktivierung von NF-κB nach pro-inflammatorischen Stimuli und die Verhinderung einer TNFα-induzierten Apoptose, beispielsweise in T-Lymphozyten, verantwortlich ist [82], kommen dem IKKα-spezifischen Signalweg mehr zelltypspezifische Aufgaben zu. So ist IKKα unter anderem für die Differenzierung von Haut und Skelettsystem essenziell [41,89]. Gleichzeitig hat die IKKα-abhängige NF-κB-Aktivierung eine herausragende Bedeutung für die adaptive Immunantwort, da sie an der B-Lymphopoese und an der strukturellen Formation von sekundären Lymphorganen beteiligt ist [81].

1.3 NF-κB und Apoptose

Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der Integrität und Homöostase der Zellen im Gewebsverband aufrechterhält. Darüber hinaus stellt Apoptose einen wesentlichen Mechanismus zur Kontrolle und Modulation immunologischer Antworten dar.

NF-κB ist als wichtiger Regulator des programmierten Zelltods Typ 1 (Apoptose) bekannt. Hierbei reguliert NF-κB sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Mechanismen über die direkte und indirekte Regulation entsprechender Zielgene. Nach Zellstimulation sind vor allem anti-apoptotische Funktionen von NF-κB gut untersucht [6]. Zu den durch NF-κB regulierten anti-apoptotischen Genen zählen unter anderem A1/Bfl1 [53,95] und Bcl-x_L [66], beide zur Bcl-2-Familie gehörend, aber auch c-Flip [66], XIAP [88] und cIAP1/2 [17,95]. In B-Lymphozyten beispielsweise vollzieht NF-κB anti-apoptotische Funktionen durch die Induktion der Expression von Bcl-2 und anderen anti-apoptotischen Genen [32]. Einzelne Moleküle des NF-κB-Signalweges sind für die anti-apoptotischen Funktionen von NF-κB unabdingbar. So ist bekannt, dass eine

Defizienz von IKKβ im Mausmodell während der Fetalzeit zu einer durch TNFα-induzierten Apoptose von Hepatozyten und intrauterinem Tod nach 12,5 Tagen führt [54]. Auch RelA- sowie RelA-/p50-defiziente Mäuse unterliegen einem embryonalen Tod aufgrund einer Apoptose von Hepatozyten [38]. Zudem ist gezeigt worden, dass IKKβ$^{-/-}$-Makrophagen, in denen NF-κB vollständig unterdrückt ist, sehr sensitiv auf eine LPS-induzierte Apoptose reagieren [40]. Diese Erkenntnisse unterstreichen die herausragende anti-apoptotische Funktion des NF-κB-Signalweges.

Neben vielen anti-apoptotischen Genen reguliert NF-κB aber auch die Expression von pro-aptotischen Genen, wie beispielsweise Bax, das zur Bcl-2-Familie gehört [7]. Zusätzlich sind einige zelltypspezifische pro-apoptotische Funktionen bekannt. In sich entwickelnden Vogel-Embryos beispielsweise kann eine Apoptose durch die Überexpression von c-Rel verursacht werden [1]. So hat NF-κB neben der gut dokumentierten pro-inflammatorischen Funktion [5] auch anti-inflammatorische und pro-apoptotische Eigenschaften, die zur Auflösung einer Entzündung beitragen können. Grundsätzlich kommt dabei der Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen sowie einer vermehrten Apoptose von Leukozyten besondere Bedeutung zu [52]. Genauere Erkenntnisse zum Stellenwert von NF-κB im Rahmen der Auflösung einer Entzündung fehlen allerdings bisher.

1.4 Phagozytose und programmierter Zelltod

Makrophagen haben Bedeutung für die Eliminierung apoptotischer Entzündungszellen sowie für die Phagozytose bakteriellen Materials. Die Phagozytose von viralen, bakteriellen und fungiziden Pathogenen bildet die Voraussetzung für deren Abwehr.

Interessanterweise kann die Phagozytose von Bakterien mit dem Zelltod der phagozytierenden Zelle einhergehen. Hierbei spricht man von Phagozytose-induziertem Zelltod (PICD). Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass der PICD mit verschiedenen Formen des

Zelltods, wie Apoptose, Nekrose und Autophagozytose, in Verbindung gebracht werden kann [12,35].

Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken und E.coli überleben, anders als beispielsweise Salmonellen, Shigellen und Listerien, nicht in Makrophagen, nachdem sie von diesen phagozytiert worden sind. Ganz im Gegenteil kann die Phagozytose solcher weniger virulenten Bakterien wie E.coli über die Induktion verschiedener Signalwege (z.B NF-κB, JNK u.a.) zum programmierten Zelltod der Makrophagen und somit zur Elimination des Erregers führen [24,33,48]. Andererseits nutzen Pathogene, wie z.B. Salmonellen, die Induktion des PICD, um Abwehrzellen zu eliminieren und zu überleben [35].

Die genaue Bedeutung des Phagozytose-induzierten Zelltods (PICD) in Makrophagen für die Auflösung einer Inflammation sowie Mechanismen des PICDs sind bisher nicht ausreichend untersucht. Es gibt Hinweise, dass Zelltod in pro-inflammatorischen Prozessen hauptsächlich durch einen nekrotischen Vorgang ausgelöst wird, während die Terminierung einer Immunantwort wesentlich von apoptotischen Prozessen abhängt [77].

Bis vor einigen Jahren wurde der Zelltod klar in zwei Formen geteilt. Die Apoptose (= programmierter Zelltod) wurde vom nekrotischen Zelltod unterschieden. Es hat sich allerdings als schwierig erwiesen, diese klassische Trennung aufrechtzuerhalten, da inzwischen bekannt ist, dass einige Zellen unter bestimmten Bedingungen gleichzeitig Zeichen der Apoptose und der Nekrose aufweisen. So gibt es Hinweise darauf, dass sogenannte Todesrezeptoren (z.B. aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie) sowie mit diesen Rezeptoren interagierende Proteine einen Casapase-unabhängigen Zelltod induzieren können, der mit dem morphologischen Erscheinungsbild der Nekrose einhergeht [15,37].

Heute geht man davon aus, dass im Rahmen des Zelltods neben der Nekrose zwei weitere Formen des Zelltods vorkommen, eine strikte Trennung jedoch nicht möglich ist. Die bisher häufig mit dem programmierten Zelltod gleichgesetzte Apoptose wird nach dieser Einteilung als programmierter Zelltod Typ I beschrieben. Programmierter Zelltod Typ II wird die erst seit kurzem ins

wissenschaftliche Interesse gerückte Autophagozytose genannt. Nekrose selbst gilt nicht als Form des programmierten Zelltods.

1.4.1 Apoptose und Nekrose

Morphologische Charakteristika der Apoptose sind Zellschrumpfung, Kernschrumpfung (Pyknosis), Chromatinkondensation, Ausknospen der Zellmembran (Membrane Blebbing), Kernfragmentation (Karyorrhexis) sowie die Bildung apoptotischer Körperchen [47]. Diese morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle gehen mit der Aktivierung von Caspasen sowie einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran einher [20]. Die Familie der Caspasen umfasst eine Gruppe von Cystein-Proteasen, unter denen sich sogenannte Initiator-Caspasen von Effektor-Caspasen unterscheiden lassen. Zu den Initiator-Caspasen zählen unter anderem die Caspase 1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 und -14. Als Effektor-Caspasen sind die Caspase 3, -6 und -7 zu nennen. Während die Initiator-Caspasen durch Autoprozessing wie beispielsweise Oligomerisation aktiviert werden [99], hängt die Aktivierung der Effektor-Caspasen von der Aktivität anderer Proteasen, wie den Initiator-Caspasen, ab [20]. Die proteolytische Spaltung von Zellbestandteilen sowie die Fragmentation der DNA durch Effektor-Caspasen wie Caspase 3 gehören zu den typischsten Merkmalen der Apoptose [60]. Vor allem aktive Caspase 3 ist dabei essenziell für das Auftreten von Apoptosezeichen. So konnte bei Zelltodanalysen von mehreren Zelltypen aus Caspase 3-Knockout-Mäusen eine Inhibition von typischen Apoptosezeichen, wie Membrane Blebbing, DNA- und Zellkernfragmentation, nachgewiesen werden [96,102].

Im Gegensatz zur Apoptose stellt die Nekrose einen passiven Vorgang im Organismus dar. Der nekrotische Zelltod resultiert aus Membranschäden der Zelle, die entweder direkt oder indirekt aufgrund von fehlenden Energievorräten entstehen. Das morphologische Bild der Nekrose ist durch stark geschwollene Zellen, die zytoplasmatische Bestandteile verlieren, gekennzeichnet. Die Nekrose geht in vivo mit starken pro-inflammatorischen Signalen einher, während apoptotische Zellen schneller phagozytiert werden und somit einen geringeren pro-inflammatorischen Stimulus für den Organismus darstellen [47]. Im Gegensatz

zur Nekrose wird der apoptotische Zelltod von Entzündungszellen als ein Mechanismus zur Beendigung einer Entzündungsreaktion angesehen.

1.4.2 Autophagozytose

Während sowohl die Morphologie, Biochemie und biologische Bedeutung der Nekrose und der Apoptose bereits gut erforscht wurden, ist die genaue biologische Aufgabe der Autophagozytose bislang nicht eindeutig geklärt.

Drei Formen der Autophagozytose können unterschieden werden: Chaperone-vermittelte Autophagozytose, Mikroautophagozytose und Makroautophagozytose. Die ersten morphologischen Hinweise auf das Vorkommen von Mikro- und Makroautophagozytose in Säugetieren existieren seit fast 40 Jahren [22].

Makroautophagozytose, meist einfach als Autophagozytose bezeichnet, ist die bekannteste Form der Autophagozytose. Sie stellt die Hauptroute für den lysosomalen Proteinabbau dar und ist morphologisch durch folgende Merkmale gekennzeichnet: Autophagozytotische Zellen enthalten während der frühen Stadien zahlreiche sogenannte autophagozytotische Vakuolen (Autophagosomen), die sich durch eine Doppelmembran von anderen Vakuolen abgrenzen lassen [4]. Die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum dieser Zellen sowie der Golgiapparat können teilweise stark vergrößert erscheinen. Die Plasmamembran verliert spezielle Ausprägungen wie Mikrovilli und Tight-Junctions, es kann zur Ausbildung eines Membranblebbings kommen. Während der späten Phase der Autophagozytose nehmen die Vakuolen deutlich an Größe und Zahl zu [18]. Charakteristisch für Autophagosomen ist, dass sie aus einer doppel- oder auch mehrschichtigen Membran bestehen. Die Bildung von Autophagosomen vollzieht sich über die Zwischenstufe der sogenannten Isolations-Membran. Diese formt sich zunächst tassenförmig und verlängert sich im Folgenden so lange, bis sich ein geschlossenes Autophagosom bildet. Verschmelzen Autophagosomen mit Lysosomen, entstehen die sogenannten Autophagolysosomen [25,26,79].

Gene, deren Produkte für den Ablauf der Autophagozytose verantwortlich sind, werden als sogenannte Atg- (autophagy related) Gene bezeichnet. Für die

Bildung von Autophagosomen und Autophagolysosomen werden unter anderem Atg5, Atg12 und Atg7 benötigt [64,91]. Es ist bekannt, dass bei Fehlen eines dieser Proteine, wie z.B. Atg5, die Bildung der Autophagosomen nicht ablaufen kann [27,65].

Essenziell für die Bildung von Autophagosomen ist auch der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex. Zu diesem Komplex gehört das Bcl-2-interagierende Gen Beclin 1, das Homolog zum Atg6 der Hefe [56].

Ein weiteres Schlüsselmolekül für die Autophagozytose ist LC3, das dem Atg8 in Hefezellen entspricht. LC3 liegt sowohl innen wie auch außen an den Autophagosomen-Membranen vor [43], aber auch an den Isolations-Membranen und im Zytosol. Unter nährstoffreichen Bedingungen liegt LC3 in einem regelmäßigen Muster diffus verteilt im Zytoplasma vor. Bei Nährstoffentzug kommt es zur spezifischen Translokation von LC3 in die Autophagosomen.

Als Hemmstoff der Autophagozytose wird heute meist das Purinanalogon 3-Methyladenine (3-MA) eingesetzt. Seglen und Gordon beschrieben bereits 1982 eine spezifische Hemmung der Autophagozytose durch 3-MA in Hepatozyten von Ratten, die u.a. durch eine Hemmung der Bildung von Autophagosomen bedingt ist [80].

Physiologisch spielt die Autophagozytose für zahlreiche Prozesse eine wichtige Rolle. Als eine Hauptaufgabe kann die Degradierung von Organellen genannt werden, beispielsweise im Rahmen von zellulärer Differenzierung [93].

Autophagozytose kann als ein Prozess beschrieben werden, der in Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Zelle auftritt. Unter Nährstoffentzug und fehlenden Wachstumsfaktoren kann in Zellen die Induktion von Autophagozytose beobachtet werden [61,63]. In diesem Fall führt sie nicht zum Zelltod, sondern stellt der Zelle einen Mechanismus zur Verfügung, um sich vor dem Zelltod zu schützen. Diese Funktion der Autophagozytose kommt auch in der Neonatalperiode zum Tragen [49].

Autophagozytose wird auch im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen beobachtet. Viele neurodegenerative Erkrankungen wie M.Parkinson [3], Chorea Huntington [98] und M.Alzheimer [69,101] sind durch eine Akkumulation von Autophagosomen gekennzeichnet. Aber auch für die

Pathogenese von Myopathien scheint die Autophagozytose eine wesentliche Rolle zu spielen [68,90]. Für beide Erkrankungsgruppen ist jedoch die genaue pathophysiologische Bedeutung der Autophagozytose bisher unklar.

Einige für die Autophagozytose relevante Gene haben onkologische Bedeutung, so z.B. das Tumorsupressorgen Beclin 1. Ein Defekt im Beclin 1-Gen wird beispielsweise für die Entstehung vieler Mamma-, Prostata- und Ovarialtumore verantwortlich gemacht [2]. Dabei scheint Beclin 1 über die Induktion der Autophagozytose unkontrollierte zelluläre Proliferation zu inhibieren [56]. Zudem weiß man, dass der Mechanismus der Autophagozytose von Tumorzellen genutzt wird, um unter den Bedingungen eines limitierten Nährstoff- und verminderten Sauerstoffangebots vor allem in den inneren, weniger gut durchbluteten Tumorregionen zu überleben [75].

Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich im Rahmen der Phagozytose von Bakterien. Viele pathogene Keime nutzen Mechanismen der Autophagozytose, um im Wirtsorganismus überleben und sich replizieren zu können. So tötet Salmonella enterica über die Aktivität des Proteins SipB Makrophagen, indem es Mitochondrien zerstört und gleichzeitig einen autophagozytotischen Zelltod induziert [35].

Auch für die Pathogenität der Shigellen (Shigella flexneri) ist eine Assoziation mit der Autophagozytose bekannt. Zwar induziert das Oberflächenprotein VirG über Bindung von Atg5 eine Autophagozytose, IcsB, ein Effektorprotein von Shigella flexneri, ist jedoch in der Lage, den Ablauf der Autophagozytose zu verhindern. Wie auch Listeria monocytogenes [92] und Rickettsien [29] können Shigellen somit aus Phagosomen ins Zytoplasma der Wirtszelle entfliehen, sich dort vermehren und in Nachbarzellen über Aktin-Polymerisation eindringen [72].

Die Autophagozytose von Zellen stellt also einen bislang nur partiell erforschten Zellmechanismus dar, welcher sowohl physiologische Aufgaben erfüllt, aber auch zum Krankheitsgeschehen beitragen kann. Dabei wird die Autophagozytose zunehmend als eigenständiger zellulärer Mechanismus angesehen und der Apoptose gegenübergestellt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die genaue biologische Bedeutung des Phagozytose-induzierten Zelltods ist bisher nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass der Verlust von Immunzellen eine Schwächung für den Organismus bei der Abwehr einer Infektion bedeutet. Im Gegensatz hierzu scheint der Zelltod von Entzündungszellen wie Makrophagen aber auch wichtig zu sein, um eine inflammatorische Immunreaktion zu beenden [48]. Es erscheint möglich, dass sowohl die Auslösung einer Entzündung als auch deren Terminierung durch den Phagozytose-induzierten Zelltod von Makrophagen beeinflusst werden.

In vergleichbarer Weise reguliert der NF-κB-Signaltransduktionsweg pro- und anti-inflammatorische Abläufe im Rahmen einer Immunabwehr. Hierbei hat auch der Verlauf der NF-κB-Aktivierung in zwei Phasen wesentliche Bedeutung [34]. Während die erste Phase der Aktivierung vor allem für pro-inflammatorische Aufgaben zuständig ist, weiss man über die prolongierte Phase der NF-κB-Aktivierung eher wenig. Man nimmt an, dass sie zelltypspezifischen Aufgaben dient, wie z.B. der bereits erwähnten Leukozytenapoptose, und damit zur Auflösung der Entzündung beitragen könnte [51,52].

Die Apoptose als bekannteste Form des programmierten Zelltods wird als wesentlicher Faktor für die Entzündungsresolution beschrieben. Der Zusammenhang von Apoptose und Autophagozytose sowie der Einfluss der Autophagozytose auf zahlreiche physiologische und pathologische Vorgänge im Organismus werden in den letzten Jahren zunehmend untersucht. Die Bedeutung der prolongierten NF-κB-Aktivierung für den Ablauf des PICD als Apoptose oder Autophagozytose ist bisher weitgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht daher den Zusammenhang zwischen der prolongierten Phase der NF-κB-Aktivierung und der Form des zu beobachtenden Zelltods. Mit Hilfe eines In-vitro-Systems, in dem die prolongierte Aktivierungsphase von NF-κB durch stabile Transfektion von Raw 264.7-Makrophagen mit einem IκBα-Superrepressor inhibiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung des klassischen NF-κB-Signalwegs für den PICD von Makrophagen untersucht.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck, Sigma, Roth, USB, Riedel-de Haen, Fluka und Bio-Rad bezogen. Die für die Molekularbiologie verwendeten Enzyme stammen von den Firmen Roche, Invitrogen und Promega.

Produkt	**Firma**	**Bestellnummer**
Acrylamid-Bis 29:1 30%	Serva	10687
Agarose SeaKem	Me FMC Bioproducts	1-800-341-1574
Aqua B. Braun	Braun	75/12604052/0503
Bovine Serum Albumin Fraction V	PAA Laboratories GmbH	K41-001-100
DNAse I, RNAse-free	Roche	10776785001
EDTA Dinatrium Dihydrat zur Analyse	AppliChem	A3553.0500
Proteinase K	Roche	1092766
RNAse, DNAse-free	Roche	1119915
Sucrose	Fluka	84097
Staurosporin ready made	Sigma- Aldrich	S 6942
DABCO (1,4 Diazobizyklo-[2,2,2]-Oktan)	Sigma	D2522
Mowiol 4-88	Calbiochem	475904

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad	500-0006
Nitrozellulose-Membran	Bio-Rad	162-0115
Precision plus Protein Standard Kaleidoscope	Bio-Rad	161-0375
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce	21059
Super Signal West Femto Stable Peroxide Buffer	CIB Pierce	34095
Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution	CIB Pierce	34095
RNAiFect Transfection Reagent 0,5ml	Qiagen GmbH	1024486
1st Strand Buffer 5x	GIBCO BRL	
RNAse Out Ribonuclease Inhibitor (recombined)	GIBCO BRL	10777-019
dN6-Primer 0,1 µg/ µl (50 pmol/µl)	Invitrogen	48190-011
dNTP 10mM Mix C114 B	Promega	6250706
0,1 M DTT	GIBCO BRL	
Super Script Reverse Transcriptase	GIBCO BRL	18053-017
Taq Polymerase	MBI Fermentas	EP0282
TEMED	Sigma	T8133

2.2 Lösungen

2.2.1 Medien für Zellkultur

Medium für Zellkultivierung von Raw 264.7-Makrophagen: DMEM (Invitrogen), 0,11 g/l Na-Pyruvat, Pyridoxin; 10 % FCS (Sigma); 1x L-Alanyl; L-Glutamin (Glutamax (100x) (Invitrogen)); 1 % NEAA (Invitrogen); 0,02 mg/ml Refobacin (Merck)

LB-Medium für E.coli-Kultur: 0,5 % Hefe-Extrakt (Invitrogen); 1 % Trypton (Invitrogen); 0,5 % NaCl add 100 ml Aqua steril (Braun)

2.2.2 Puffer

TBE einfach: 0,45 mM Tris-Cl; 0,45 mM Na-Borat; 10 mM EDTA pH 8,0

TBS 10fach: 0,1 M TrisHCl pH 8; 87,7 g NaCl add 1 l Aqua dest.

2.2.3 Dilutionspuffer für Western Blot

Erst-Antikörper-Dilutionspuffer: 5 % BSA; 0,1 % Tween 20 in 1x TBS

BlottoA: 5 % Milchpulver; 0,05 % Tween 20 in 1x TBS

BlottoB: 1 % Milchpulver; 1 % BSA; 0,1 % Tween 20 in 1x TBS

2.3 Antikörper

2.3.1 Erst-Antikörper

Tab. 1 *Eingesetzte Antikörper mit Angaben zu Firma und Bestellnummer. Spalte 3 und 4 geben die jeweilige für den Western Blot eingesetzte Verdünnung und die Verdünnungslösung an. Bax: „Bcl-2-associated-X protein“, Becn1: Beclin 1, Ciap (=cIAP): „c-linked inhibtior of apoptosis protein”, FAS: Synonym für CD 95, HRP: „Horse Radish Peroxidase“, IgG: ImmunglobulinG, IκBα: inhibitorisches kappa B alpha, JNK: c-Jun-NH_2-terminale Kinase, TBS: Tris-Puffer-Lösung, Tween 20: Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat.*

Antikörper	**Hersteller**	**Verdünnung**	**Dilutionspuffer**
Anti-Bax (rabbit polyclonal IgG)	Upstate # 06-499	1:1000	Erst-Antikörper-Dilutionspuffer, Blockier- und Waschlösung BlottoB
Aktin HRP (c-11) Goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Sc 1615	1:1500	5 %- 10 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20
Becn1 (H300)	Santa Cruz Biotechnology Sc 11427	1:3000	BlottoA
c-Jun (phospho 573) (rabbit polyclonal IgG)	Abcam Ab 4727-50	1:1000	Erst-Antikörper-Dilutionspuffer, Blockier- und Waschlösung BlottoB
JNK-1 (c-17) (rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology Sc 474	1:1000	7,5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20
JNK-2 (d-2) (Mouse monoclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology Sc 7345	1:1000	7,5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20

Caspase 3 (8G10) (rabbit monoclonal antibody 1:10000)	Cell Signaling	1:1000	7,5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20
Fas-Ligand	Transduction Laboratories 606-259-1550 #F37720	1:1000	BlottoB
Ciap 2 (H-85) (rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology	1:10000	BlottoB
IκBα (c-21) (rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology Sc 371	1:1500	5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20
p65 (c-20) (rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz Bitotechnology Sc 109	1:2500	5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20

2.3.2 Zweit-Antikörper

Als Zweit-Antikörper wurden die folgenden Produkte eingesetzt:

HRP rabbit (goat anti-Rabbit sc 2004); Santa Cruz Biotechnology

HRP Anti-Goat (sc 2020); Santa Cruz Biotechnology

GAM-HRP 0,5 m L9701102 Rev C; Bio Rad

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellkultivierung von Raw 264.7-Makrophagen

Gefrorene Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff in einem Wasserbad bei 37℃ angetaut. Um toxisches DMSO des Einfriermediums (FCS; 15 % DMSO) so schnell wie möglich zu verdünnen, wurden die noch nicht vollständig aufgetauten Zellen in Medium überführt und einmal mit Mediumslösung gewaschen (800 g_E, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in Nunc-Zellkulturflaschen bei 37℃ in 5 % CO_2 kultiviert. Für die Langzeitkultivierung von transfizierten Zellen wurden dem Medium zusätzlich 250 µg/ml Geniticin (SR-, Mock-Klone) zugesetzt.

3.1.2 Transfektion

3.1.2.1 Lipofektion mit Fugene 6™

Für die Transfektion mit Fugene 6 (Roche) wurden Raw 264.7-Makrophagen in 6-Loch-Platten bis zu einer 60 %igen Konfluenz gezogen. Anschließend wurden die Zellen unter Einsatz von 1 µg Plasmid-DNA und 3 µl Fugene 6 transfiziert. Der IκBα-Superrepressor (IκBαSR) wurde freundlicherweise von Dr. R. Zwacka (IZKF, Universtät Ulm) zur Verfügung gestellt. Dieses pcDNA3-Konstrukt enthält eine an der Position Ser32/Ser36 mutierte Sequenz und kann somit nicht phosphoryliert werden (A32/A36). 48 h nach erfolgter Transfektion wurde die Selektion der Neomycin-resistenten Zellen mit Geniticin (500 µg/ml; Invitrogen) begonnen. Die selektionierten Zellen wurden subkloniert. SR-Klone wurden funktionell auf reduzierte NF-κB-DNA-Bindungsaktivität nach LPS-Stimulation und E.coli-Stimulation überprüft. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Klon SR 3, dem Klon SR 19 und dem Klon Mock 23 durchgeführt.

3.1.3 Stimulation mit E.coli, Staurosporin und LPS

Für alle Experimente wurden Raw 264.7-Makrophagen mindestens 12 h vor dem ersten Stimulationszeitpunkt auf Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden

anschließend für eine Stunde mit $5x10^6$ E.coli Top10 inkubiert. Dies entspricht einer 1:100 verdünnten E.coli-Suspension mit einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 0,6. Nach einer Stunde wurde das Medium gewechselt und die Raw 264.7-Makrophagen wurden für weitere 12 h, 24 h, 36 h oder 48 h bei 37℃ und 5 % CO_2 ohne E.coli kultiviert.

Die Stimulation mit LPS erfolgte mit 1 µg/ml (von Escherichia coli O26:B6, Sigma). Zusätzlich wurde für einige Versuchsreihen mit 1 µg/ml Staurosporin (Sigma) für 3 h stimuliert.

Für alle Experimente außer den gesondert beschriebenen wurden Raw 264.7-Makrophagen im Medium abgekratzt und anschließend mindestens einmal durch Zentrifugieren (800 g_E, 5 min, 4℃) mit kaltem PBS gewaschen.

3.1.4 Inkubation mit 3-Methyladenin

Die Inhibition der Autophagozytose wurde mit 3-Methyladenin (3-MA) durchgeführt. Dazu wurden die Raw 264.7-Makrophagen vor der E.coli-Inkubation mit 10 mM 3-MA (gelöst in 3 % Essigsäure) für 30 min bei 37℃ vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben für eine Stunde mit E.coli stimuliert. Das Medium für den folgenden Mediumwechsel wurde ebenfalls mit 3-MA (10 mM) versetzt.

3.1.5 Fotografie von Raw 264.7-Makrophagen

Sterile Deckgläschen wurden in genügend großem Abstand voneinander in Zellkulturschalen gelegt. Anschließend wurden Raw 264.7-Makrophagen in diese Zellkulturplatten ausgesät und mit E.coli oder Staurosporin behandelt (siehe 3.1.3). Die Deckgläschen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten auf Objektträger gelegt und im Lichtmikroskop (Firma Leica) analysiert. Ein repräsentatives Gesichtsfeld wurde mit einem Scanner (Firma Leica) aufgenommen.

3.1.6 Visualisierung autophagozytotischer Vakuolen mit Monodansylcadaverin

Autophagozytotische Vakuolen können nach Biederbick et al. (1995) mit Monodansylcadaverin (MDC) angefärbt werden [8]. Hierzu wurden die auf

Deckgläschen ausgesäten und mit E.coli stimulierten Zellen bei 37℃ eine Stunde mit 50 µM MDC inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach 30-minütiger Fixation mit 4 %igem Paraformaldehyd wurden die Zellen erneut viermal mit PBS gespült und abschließend mit Mowiol-Mix eingedeckt. Zur Herstellung des Mowiol-Mix wurden 2,4 g Mowiol und 6 g Glycerol in 6 ml Aqua dest. gelöst und bei Raumtemperatur für einige Stunden stehen gelassen. 12 ml 0,2 M TrisHCl (pH 8,5) wurden zugegeben und der Ansatz für 10 min auf 50℃ erhitzt. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 5000 g_E zentrifugiert und bei -20℃ gelagert. Vor der Verwendung des Mowiol-Mixes wurden 100 mg/ml DABCO zugegeben und bei 37℃ gelöst. Die mit Mowiol-Mix fixierten Zellen wu rden mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss) gescannt und fotografiert.

3.1.7 Trypanblaufärbung

Nach entsprechender Stimulation mit E.coli, LPS oder Staurosporin wurden Raw 264.7-Makrophagen in 1 %ige Trypanblaulösung aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Es wurden insgesamt pro Zeitwert mindestens 400 Zellen gezählt und dabei die Anzahl der toten, blau angefärbten Zellen bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis toter Zellen pro 100 Zellen der Gesamtpopulation gebildet.

3.1.8 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

3.1.8.1 Zellzyklusanalyse nach Ethanolfixation

Stimulierte, abgelöste und gewaschene Raw 264.7-Makrophagen wurden in 500 µl PBS aufgenommen. Zur Fixation und Permeabilisierung der Zellen wurde tropfenweise 500 µl eiskaltes Ethanol (100 %) zugegeben und die Zellen mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen zweimal mit kaltem PBS zentrifugiert (800 g_E, 5 min) und in 400 µl Färbelösung (200 µg Propidiumiodid, 2 µg RNAse ad 10 ml PBS) aufgenommen. Die Zellen wurden innerhalb einer Stunde im FACS analysiert. Die Emission des DNA-interkalierenden Farbstoffs PI wurde unter Verwendung der Fluoreszenz 2 im FACS gemessen.

3.1.8.2 Färbung nach Nicoletti (1991)

Stimulierte, abgelöste und gewaschene Zellen wurden in 500 µl Nicoletti-Puffer (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton-X-100, Propidiumiodid 50 µg/µl) zur Präparation der Zellkerne aufgenommen und für mindestens 12 h bei 4℃ inkubiert [67]. Im FACS wurde anschließend die Rate der hypochromen, apoptotischen Zellen analysiert.

3.1.9 Inkubation mit konditioniertem Medium

Um zellunabhängige Effekte zu untersuchen, wurde das Medium von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen 24 h nach einstündiger Stimulation mit E.coli (s. 3.1.3) gesammelt, steril filtriert und bei -80℃ aufbewahrt (= konditioniertes Medium).

Mock 23-, SR 3- und SR 19-Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von $1x10^5$ Zellen/Loch ausgesät, 24 h vorinkubiert und anschließend nach dem unten dargestellten Schema (vgl. Abb. 1) mit konditioniertem Medium inkubiert.

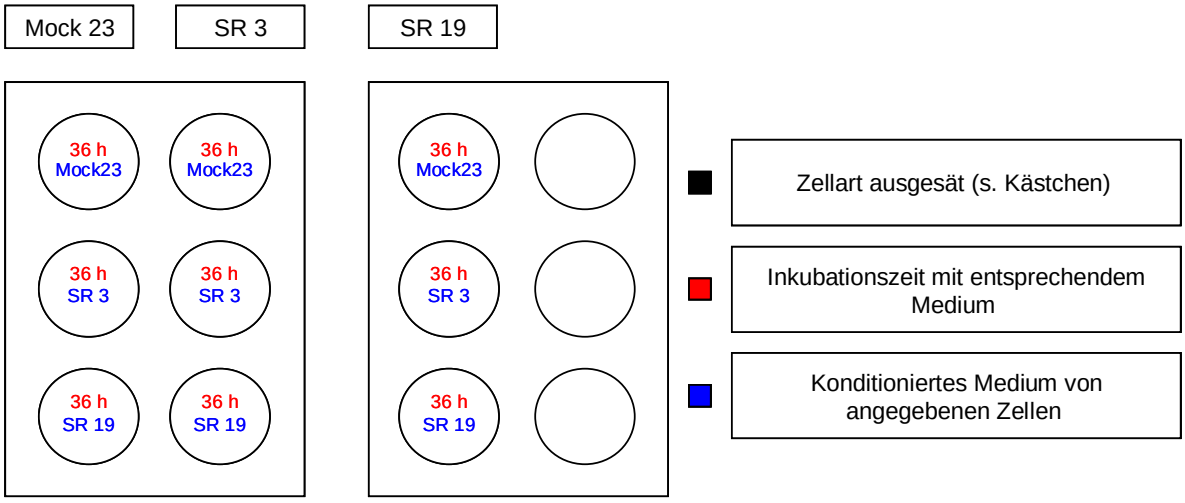


Abb. 1 *Versuchsaufbau für die Inkubation von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen mit 24 h konditioniertem Medium. Der hier dargestellte Ansatz wurde für Inkubationszeiten von 36 h, 24 h und 12 h durchgeführt. Zusätzlich wurden je eine Kontrollprobe unstimulierter Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen angesetzt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen).*

Dabei wurden ebenfalls 6-Loch-Platten für Inkubationszeiten von 12 h und 24 h angesetzt. Als Kontrolle wurde je ein Loch mit Mock 23-, SR 3- und SR 19-Zellen ausgesät, bei dem kein Austausch des Mediums vorgenommen wurde.

Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen im Medium abgekratzt und zweimal mit kaltem PBS durch Zentrifugieren gewaschen. Die anschließende Messung und Analyse des Zellzyklus wurde, wie unter 3.1.8.1 beschrieben, durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische/biochemische Verfahren

3.2.1 Präparation genomischer DNA (DNA-Fragmentierung)

Nach Zugabe von Lysepuffer für die DNA-Extraktion (0,5 % SDS; 0,1 mg/ml Proteinase K; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 25 mM EDTA;) und vollständiger Resuspension wurden Raw 264.7-Makrophagen mindestens eine Stunde bei 56°C lysiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die DNA zunächst mindestens zweimal mit einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25/24/1) extrahiert, abschließend noch mindestens einmal mit dem gleichen Volumen an Chloroform.

Nach dieser Extraktion wurde die DNA mit 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung und dem doppeltem Volumen Ethanol (100 %) durch 30 min Zentrifugieren (20000 g_E) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit Ethanol (75 %) gewaschen und abschließend in 10 mM Trispuffer (pH 7,5-8,5) aufgenommen.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch im „GeneQuant Pro“ (Pharmacia) bestimmt. Die Konzentrationen wurden dabei automatisch aus der Absorption bei 260 nm berechnet. 5 µg genomischer DNA wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert (siehe 3.2.2).

3.2.2 Trennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Blaupuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylolcyanol FF; 30 % Glycerol in Aqua dest.) gemischt und auf ein Agarosegel (1,2 % Agarose, 1x TBE, 0,005 % Ethidiumbromid) aufgetragen. Die

Trennung erfolgte in 1x TBE-Laufpuffer für ca 1,5 h bei 110 Volt. Im ultravioletten Licht konnte die DNA anschließend visualisiert und fotografiert werden.

3.2.3 RNA-Präparation (Single-Step-Methode nach Chomzynski und Sacchi)

Das Medium wurde von den mit E.coli stimulierten Raw 264.7-Makrophagen vorsichtig abgenommen. Die Zellen wurden anschließend einmal vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen und in 3 ml pro 75 cm^2 Denaturierungspuffer (4 M Guanidinium-Isothiocyanat; 25 mM NatriumCitrat pH 7; 0,5 % N-Lauroylsarkosyl, behandelt mit 0,2 % DEPC; 0,1 M β-Mercaptoethanol wurde jedes Mal frisch zugegeben) direkt auf den Zellkulturplatten lysiert [16].

Das Homogenat wurde anschließend durch Inversion mit 2 M Natriumacetat pH 4,0 (100 µl/ml Denaturierungspuffer) gemischt und nach Zugabe von wassergesättigtem Phenol (unter Einsatz von 1 ml/ml Denaturierungspuffer) 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach diesem Arbeitsschritt wurde Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugegeben (200 µl/ml eingesetztem Denaturierungspuffer) und das Gemisch für 15 min auf Eis inkubiert. Die Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde durch Zentrifugieren bei 3200 g_E (45 min, 4℃) vollzogen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde abschließend mit einem Volumenanteil Isopropanol bei -20℃ 30 min gefällt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zentrifugation (4℃, 60 min, 3200 g_E). Die RNA wurde in sterilem RNAse-freien Wasser aufgenommen. 5 µg RNA wurden zur Überprüfung der Integrität auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und ca. 2 h bei 110 Volt konstant in 1x TBE-Puffer aufgetrennt.

3.2.4 Gesamtzelllysat

Raw 264.7-Makrophagen wurden in Medium abgekratzt und mit PBS durch Zentrifugation zweimal gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen wurden mindestens 30 min auf Eis mit 2 fach konzentriertem Puffer für Gesamtzelllysat (100 mM Tris pH 7,6; 500 mM NaCl; 6 mM EDTA; 6 mM EGTA; 1 % Triton-X-100; 0,5 % NP 40; 10 % Glycerol; Protease-Inhibitoren (β-Glycerolphosphat 2 mM; DTT 4 mM; Leupeptin 20 µM;

Natriumorthovanadat 0,2 mM)) lysiert. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 20000 g_E und 4℃ zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet aus Zellresten verworfen.

Die Proteinmenge des Gesamtzelllysats wurde photometrisch bestimmt und die Proben wurden so eingestellt, dass eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl vorlag. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2fach Probenpuffer (2 % SDS; 125 mM Tris-HCL (pH 6,8 bei 25℃); 10 % Glycerol; 50 mM DTT; 0,01 % Bromophenolblau) versetzt und anschließend 5 min bei 95℃ gekocht. Die erhaltenen Gesamtzelllysate wurden ausschließlich für Western Blots eingesetzt.

3.2.5 Kernlysat

Für die Präparation der Zellkerne wurden folgende Puffer verwendet:

Chelsky-Puffer (pH 7,0): 0,01 M Tris-HCl; 0,01 M NaCl; 0,003M $MgCl_2$; 0,03 M Sucrose

NP40-Puffer: Chelsky-Puffer mit 0,5 % NP40

$CaCl_2$-Puffer: Chelsky-Puffer mit 1 % 100x Stock $CaCl_2$ (10 mM)

Lysepuffer (einfach): 50 mM Tris pH 7,6; 250 mM NaCl; 3 mM EDTA; 3 mM EGTA; 1 % Triton-X-100; 0,5 % NP 40; 10 % Glycerol; Protease-Inhibitoren (Natriumorthovanadat 0,1 mM; DTT 2 mM; β-Glycerolphosphat 1 mM; Leupeptin 10 µM;)

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Puffer wurden auf eine Temperatur von 4℃ gebracht, um die Proteindegradierung so gering wie möglich zu halten.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 2 ml NP-40-Puffer pro $1x10^7$-Zellen aufgenommen und bei 1500 g_E 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschritt mit NP-40 wiederholt.

Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml $CaCl_2$-Puffer pro $1x10^7$-Zellen bei 1500 g_E 10 min gewaschen.

Das Pellet wurde in 70 bis 100 µl einfach konzentriertem Lysepuffer aufgenommen und 30 min bei 4℃ inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 30

min bei 20000 g_E (4℃) abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthielt die nukleären Proteine. Er wurde bei -80℃ gelagert.

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und durch Western Blot oder Gelshift-Assay analysiert. Die Proteinverdünnungen wurden bei -80℃ aufbewahrt. Für die Analyse durch Western Blot wurden die Proteinverdünnungen mit einem Volumen 2x Probenpuffer (208 mM SDS; 1 M Tris HCl pH 6,8; 20 % Gycerol; 8 % β-Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau) gemischt und bei 95℃ 5 min gekocht.

3.2.6 Western Blotting

3.2.6.1 Proteinauftrennung und Transfer

Für das Auftrennen der Proteine wurden 7,5 %ige, 10 %ige sowie 12 %ige Polyacrylamid-Trenngele (29:1) verwendet, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins. Als Sammelgel wurde immer ein 4,5 %iges Polyacrylamidgel auf das Trenngel gegossen.

Die Proteinmenge pro Spur im Acrylamidgel betrug 10 µg. Als Marker wurden 6 µl Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteintrennung in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 3,5 mM SDS) erfolgte bei 90 Volt, 15 min und 180 Volt für ca. 35 min.

Der Proteintransfer erfolgte auf mit Blotpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycine; 20 % Methanol (pH 8,5)) getränkte Nitrocellulose-Membranen im Halbtrocken-Verfahren (Semi-Dry-Blotter, Bio-Rad) 1 h lang bei 20 Volt. Eine gleichmäßige Proteinladung wurde nach dem Blotten mit Ponceau-Färbung überprüft.

3.2.6.2 Antikörperinkubation

Fertige Blots wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer blockiert. Sofern nicht anders beschrieben, diente der Blockpuffer gleichzeitig als Waschpuffer und Antikörperdiluent. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4℃. (vgl. 2.3.1). Nach dieser Inkubationszeit wurde der Blot sechsmal sieben min gewaschen. Der zweite Antikörper wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem Blot inkubiert. Nach Abwaschen des

ungebundenen Zweitantikörpers (s.o) wurde der Blot noch zweimal 7 min mit PBS bzw. TBS pH 7,6 oder pH 8,0 gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Supersignal (Pierce) nach Herstellerangaben. Die Exposition erfolgte auf Agfa Cronex-5-Filmen.

3.2.7 Gelshift

3.2.7.1 Elektrophorese

10 µg Proteinlysat wurden in 10 µl EMSA-Puffer (10 mM Hepes; 50 mM KCl; 10 % Glycerol; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT) mit 20.000 ^{32}P-markiertem Oligonukleotid (HIV-κB-Sequenz) 30 min bei Raumtemperatur unter Zugabe von 1 mM DTT und 1 µg poly dIdc in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert:

Oligosequenz (HIV-κB-Site) Invitrogen:

sense: 5'-GGATCCTCAACAGA**GGGGACTTTCC**GAGGCCA-3'

reverse: 5'-GGATCCTGGCCTC**GGAAAGTCCCC**TCTGTTGA-3'

Die Proben wurden auf einem 4 %igen nativen Polyacrylamidgel in 0,5x TBE- Laufpuffer aufgetrennt (3 h, 200 Volt). Zuvor wurde das Gel bei 100 Volt 30 min äquilibriert.

Nach dem Lauf wurde das Gel für 30 min fixiert (5 % Eisessig; 5 % Glycerol; 15 % Methanol in Aqua bidest) und anschließend 10 bis 15 min gewässert. Das Gel wurde auf Whatmanpapier eine Stunde bei 80℃ in einem Vakuumgeltrockner getrocknet.

Getrocknete Gele wurden ca. 24 h mit Agfa Cronex-5-Film bei -80℃ exponiert.

3.2.8 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

3.2.8.1 cDNA-Synthese

5 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden mit 0,2 µg dN_6-Primer für 10 min bei 70℃ denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrangssynthesepuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 2 µl 10 nM dNTP und 1 µl RNAse-Out (Lifetechnologies) wurde der Reaktionsansatz auf 37℃ gebracht und

anschließend 1 µl Superscript II RNase H zugegeben. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion erfolgte während einer Stunde bei 37°C. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase 15 min lang bei 75°C inaktiviert.

3.2.8.2 PCR-Reaktion

Für einen Ansatz der PCR wurden 0,2 µM dNTP, 2 mM $MgCl_2$ und 0,1 µM je Primer unter 1x PCR-Pufferbedingungen mit 0,5 µl der nach 3.2.8.1 geschriebenen cDNA und 1,25 U Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt. Alle PCRs wurden als Multiplex-PCR mit Aktin als Ladungskontrolle durchgeführt.

Verwendete Primer:
m_Atg5 sense: 5'-acg gag cgg cct ttc atc-3'
m_Atg5 reverse: 5'-ggc ttc ggc tgc att gc-3'

m_Atg7 sense: 5'-tgg ata caa gct tgg ctg cta c-3'
m_Atg7 reverse: 5'- agg gta aga ccg gtc aag tc-3'

m_Beclin 1 sense: 5'-act gga cac gag ctt caa gat c-3'
m-Beclin 1 reverse: 5'-ctc caa aca gag ttt gta gtt c-3'

Actin sense: 5'-cta caa tga gct gcg tgt gg-3'
Actin reverse: 5'- cag gtc cag acg cag gat gg-3'

Nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 95°C wurde folgender Zyklus 35x wiederholt:
Denaturierung: 45 Sekunden bei 94°C
Annealing: 45 Sekunden bei 59°C
Elongation: 45 Sekunden bei 72°C
Die Proben wurden abschließend 10 min auf 72°C erhitzt und auf eine Temperatur von 4°C abgekühlt. 10 µl der PCR Reaktion wurde im Agarosegel analysiert (siehe 3.2.2).

3.2.9 Multi-Probe RNAse-Protection-Assay

Der RNAse-Protection-Assay ist eine sehr sensitive und spezifische Methode für die Detektion und Quantifizierung von mRNA. Dabei synthetisieren DNA-abhängige RNA-Polymerasen unter Verwendung von DNA-Templaten [α^{32}P]-gelabelte anti-sense RNA. Diese gelabelte anti-sense RNA wird dann mit der zu untersuchenden isolierten RNA aus den Zellen hybridisiert. RNAse verdaut die nicht hybridiserte mRNA, so dass die zu untersuchende RNAse-geschütze mRNA im Anschluss gereinigt, nach ihrer Größe in der Gelelektrophorese getrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann.

Für diese Arbeit wurden 15 µg RNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol (100 %) gefällt und anschließend in 8 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Im Weiteren wurde der RNAse Protection Assay genau nach Anweisung der Firma BD (Instruction Manual, 7th Edition) unter Verwendung des In Vitro Transcription Kits (Katalog Nr. 556850; BD) und des RPA Kits (Katalog Nr. 556134; BD) durchgeführt. Für die Generierung der Template wurden das mApo-2 Multi-Probe Template Set (Katalog Nr.556191; BD) eingesetzt.

Abschließend wurden die Proben auf einem 8 M Harnstoff- 4,75 % Polyacrylamidgel in 0,5x TBE-Laufpuffer aufgetrennt (1,5 h, 20 Watt konstant). Zuvor wurde das Gel 30 min bei 20 Watt konstant äquilibriert. Das Gel wurde auf Whatmanpapier 30 min bei 80℃ in einem Vakuumgeltro ckner getrocknet und anschließend auf Agfa Cronex-5-Filmen bei -80℃ exp oniert.

3.3 Statistische Verfahren

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte sowie der positive und der negative Standardfehler werden graphisch dargestellt. Die Berechnung dieser Werte erfolgte mit Microsoft Excel. Die Signfikanz der Daten wurde mit dem Student's-t-Test geprüft. Verglichen wurden jeweils SR 3- und SR 19-Zellen mit dem Kontrollklon Mock. Ein $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für die graphische Darstellung des p-Werts wurde die international gängige Beschriftung verwendet, dabei steht * für $p<0,05$ und ** für $p<0,001$.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der NF-κB-Aktivierung auf den Phagozytose-induzierten Zelltod in Raw 264.7-Makrophagen vorgestellt. Dabei werden in Kapitel 4.1 und 4.2 zunächst die Ergebnisse zu zellulären Mechanismen der NF-κB-Suppression behandelt. Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4 beschäftigen sich mit den Auswirkungen der Suppression der prolongierten NF-κB-Aktivierung auf den Phagozytose-induzierten Zelltod und die Unterscheidung zwischen endogen- und exogen-induziertem Zelltod-Mechanismus. Die Ergebnisse zum phänotypischen Erscheinungsbild des durch die Phagozytose von E.coli induzierten Zelltods werden in Abschnitt 4.5 beschrieben. Kapitel 4.6 zeigt die Ergebnisse zur Klassifizierung des vorliegenden Zelltods.

4.1 Aktivität von NF-κB-Bindungsaktivität in Superrepressor- und Mock-transfizierten Raw 264.7-Makrophagen

Die Beeinflussung des NF-κB-Signalweges durch den Superrepressor wurde in Mock- und SR-Zellen über die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB untersucht. Hierzu wurden Gelshiftanalysen mit Kernextrakten der entsprechenden Zelllinien nach der Stimulation mit LPS und E.coli durchgeführt (Abb. 2 und 3).

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, können grundsätzlich zwei NF-κB-Komplexe unterschieden werden. Frühere Untersuchungen mittels Supershift-analysen haben gezeigt, dass der schwerere Komplex primär aus p65/p50-Heterodimeren und der leichtere Komplex vorwiegend aus p50-Homodimeren besteht. Zusätzlich haben diese Untersuchungen gezeigt, dass die NF-κB-Aktivität zwischen 20 und 30 min ihr Maximum erreicht und nach diesem Zeitintervall langsam wieder abklingt. Im Rahmen dieser Arbeit geht es um die späte Phase der NF-κB-Aktivierung.

Die Gelshift-Analyse der nukleären NF-κB-Bindungsaktivität nach LPS-Stimulation liefert die in Abbildung 2 dargestellten Ergebnisse. Auch hier zeigen Mock 23-Zellen eine höhere Aktivität des aktiven p65/p50-NF-κB-Heterodimers im Kern. Während in den SR-Zellen die p65/p50-Aktivität bereits nach 30 min deutlich

abnimmt, bleibt diese in den Mock-Zellen bis zu 16 h nach der Stimulation mit LPS erhalten. Zusätzlich zeigt sich, dass der Anteil der p50/p50-Homodimere in den SR-Zellen deutlich früher steigt als in den Mock-Zellen: In den SR-Zellen ist bereits nach 1 bis 2 h ein Abklingen der NF-κB-Aktivität zu beobachten, in den Mock-Zellen hingegen erst nach 8 h. Sowohl in den SR-Zellen als auch in den Mock-Zellen ist das Abklingen der klassischen NF-κB-Aktivität mit der Induktion von p50/p50-Homodimeren verbunden. Abbildung 2 zeigt, dass die Bindungsaktivität dieser p50/p50-Homodimere in allen drei Zelllinien bis zu 16 h nach der LPS-Stimulation nachweisbar ist.

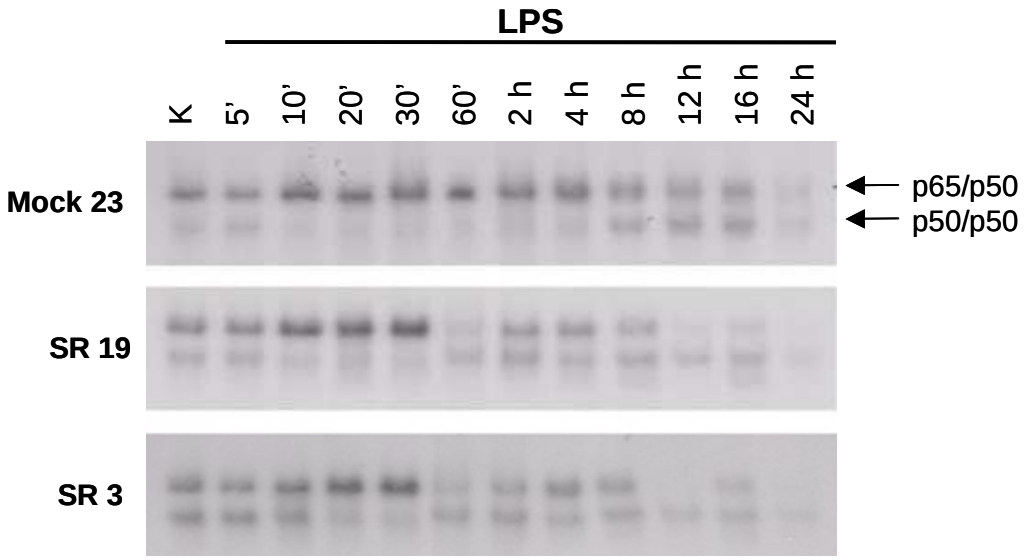


Abb. 2 *NF-κB-Aktivitätsmessung mittels Gelshift-Untersuchungen nach Langzeitstimulation von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen mit 1 μg/ml Lipopolysaccharid (LPS) (von Escherichia coli O26:B6, Sigma). SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, p65/p50: p65/p50-Heterodimere, p50/p50: p50/p50-Homodimere.*

Abbildung 3 stellt die Langzeituntersuchung der NF-κB-Bindungsaktivität nach einstündiger Phagozytose von E.coli dar. Die Gelshiftanalyse wurde durchgeführt, um zu klären, ob auch nach der Phagozytose von E.coli eine Suppression der prolongierten NF-κB-Antwort vorliegt.

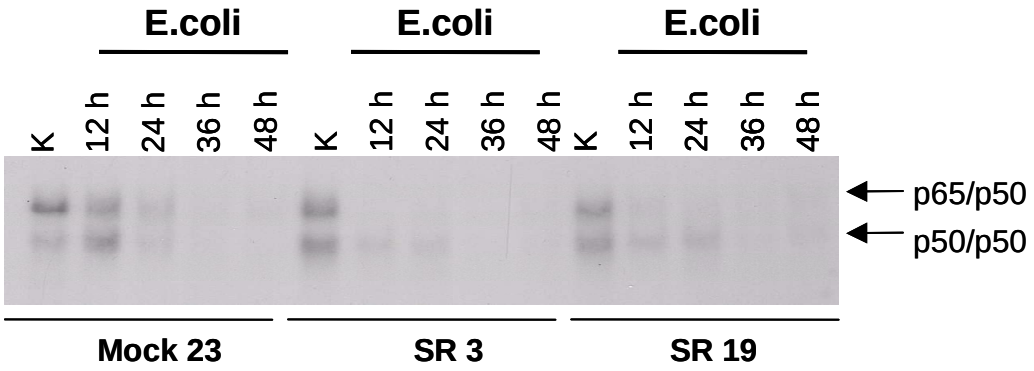


Abb. 3 *Nukleäre DNA-Bindungsaktivität von NF-κB zu angegebenen Zeitintervallen nach einstündiger Phagozytose von E.coli. Langzeituntersuchungen wurden bis zu 48 h durchgeführt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, p65/p50: p65/p50-Heterodimere, p50/p50: p50/p50-Homodimere.*

In den Mock-Zellen ist 12 h nach Phagozytose von E.coli eine deutliche NF-κB-Restaktivität erkennbar, während diese in den SR-Makrophagen nach 12 h fehlt. Diese Beobachtung trifft sowohl für die p65/p50-Heterodimere als auch für die p50/p50-Homodimere zu. 24 h nach der Phagozytose von E.coli besteht in beiden Zelllinien keine NF-κB-spezifische DNA-Bindungsaktivität mehr.

4.2 Beteiligung von Proteinen stressinduzierbarer Signalwege

4.2.1 Beteiligung von Komponenten des NF-κB-Signalweges und anderer stressinduzierbarer Signalwege im Kern

Um die Aktivierung von Mock- und SR-Zellen biochemisch zu beschreiben, wurden Western Blots von Gesamtzellextrakten mit Antikörpern gegen IKKα, JNK1, JNK2, p100, p52, IκBα und phosphoryliertes c-Jun angefertigt. Die Kernextrakte wurden mit Antikörpern gegen p52, p50 und p65 untersucht.

Bei Betrachtung der in Abbildung 4 dargestellten Western Blots des Kernextrakts aus Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen fällt auf, dass p52 sowohl in Mock 23- als auch in den SR-Makrophagen 12 h bis 24 h nach Phagozytose von E.coli eine deutliche Zunahme zeigt. Nach 36 h allerdings ist eine Abnahme von p52 im Kernextrakt zu beobachten.

P50 zeigt in beiden Zelltypen nach der Phagozytose von E.coli eine Abnahme gegenüber der Probe aus unstimulierten Zellen (Kontrolle). Die geringe Expression von p50 ist dabei in allen Zelllinien über einen Zeitraum von 48 h

konstant. Das NF-κB-Protein p65 nimmt sowohl in den SR 19- und SR 3- als auch in den Mock 23-Makrophagen 12 h nach Phagozytose zu, nach 36 h jedoch ist in allen Zellklonen eine Abnahme von p65 im Western Blot zu sehen.

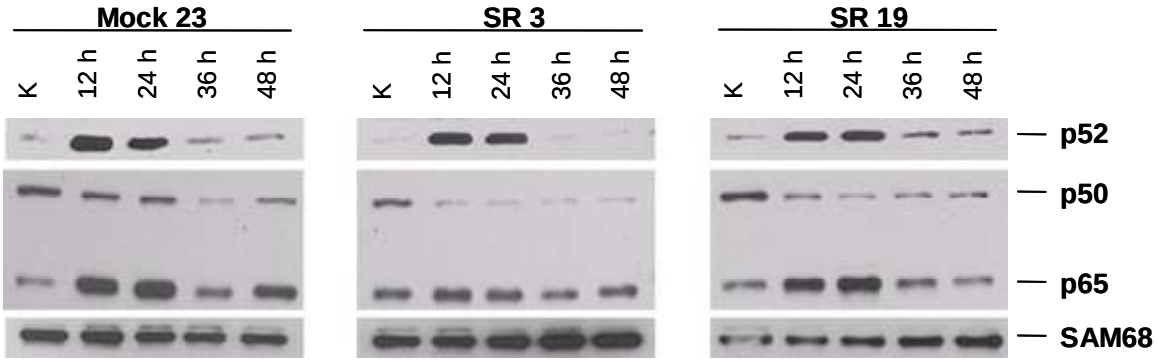


Abb. 4 *Einfluss bakterieller Phagozytose auf die Induktion der Rel-Proteine p52, p50 und p65. Western Blot-Analyse von Proteinen des NF-κB (nukleärer Faktor kappa B)-Signalweges in Kernextrakten zu angegebenen Zeitpunkten nach 1stündiger Phagozytose von Escherichia coli Top10. SAM68 = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

4.2.2 Beteiligung von Komponenten des NF-κB-Signalweges und anderer stressinduzierbarer Signalwege im Gesamtzellextrakt

Die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen Western Blots des Gesamtzellextraktes (TCL) mit Antikörpern gegen IKKα, JNK1, JNK2, p100, p52, IκBα und phosphoryliertes c-Jun. Stimulationsreihen von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen zu 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Phagozytose wurden hierbei gegeneinander aufgetragen. Als Kontrolle wurden jeweils unstimulierte Zellen hinzugenommen (K). Für jeden Zellklon wurde eine Probe mit Staurosporin für 3 h stimuliert und als Apoptosekontrolle mit aufgetragen. Für Mock 23- und SR 3-Zellen wurde zusätzlich eine Stimulationsreihe mit E.coli für 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 2 h und 4 h angefertigt. Für diese Stimulationsreihe wurde das Gesamtzellextrakt im Western Blot auf IκBα untersucht (Abbildung 5).

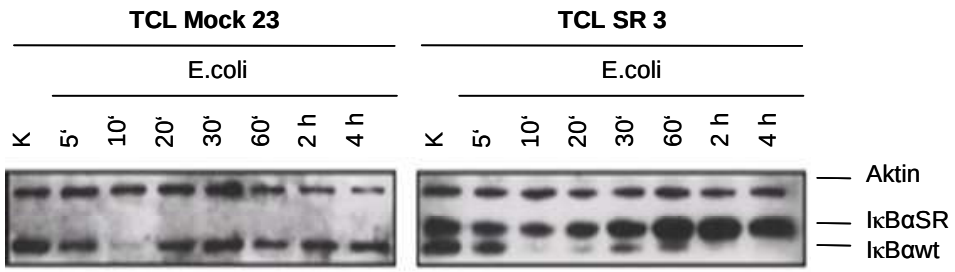


Abb.5 *Western Blots zum Einfluss bakterieller Stimulation auf den IκBα-Superrepressor im Gesamtzellextrakt (TCL). Die angegebenen Zeitwerte geben die Dauer der Stimulation mit Escherichia coli (E.coli) Top10 an. Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, IκBαSR: IκBα-Superrepressor, IκBαwt = endogenes IκBα.*

Im Western Blot mit dem Antikörper gegen IκBα erkennt man in den SR-Zellen zwei Banden. Die obere steht dabei für die Expression des IκBα-Superrepressors, während die untere Bande endogenes IκBα darstellt. Der Western Blot in Abbildung 5 zeigt, dass der Superrepressor für IκBα im SR 3-Klon konstant über einen Zeitraum von 4h nach E.coli-Stimulation exprimiert wird. Abbildung 6 zeigt u.a., dass der IκBα-Superrepressor in den SR-Klonen auch nach einstündiger Phagozytose von E.coli exprimiert wird. Dabei ist die Expression des Superrepressors nach 12 h am stärksten ausgeprägt. Auffällig war, dass nach mehreren Zellpassagen die basale SR-Expression abnahm, nach Stimulation jedoch weiterhin hohe Expressionsraten nachweisbar waren. Mit beiden Western Blots ist für die Mock 23-Zellen nur endogen exprimiertes IκBα nachzuweisen und, wie zu erwarten, wird der IκBα-Superrepressor in diesen Zellen nicht exprimiert.

Für das NF-κB-aktivierende Protein IKKα zeigen sich weder in den Mock 23- noch in den SR-Zellen auffällige Veränderungen der Expression nach der Phagozytose von E.coli. Ebenso sind für p100 im Western Blot keine Expressionsschwankungen erkennbar (vgl. Abb. 6).

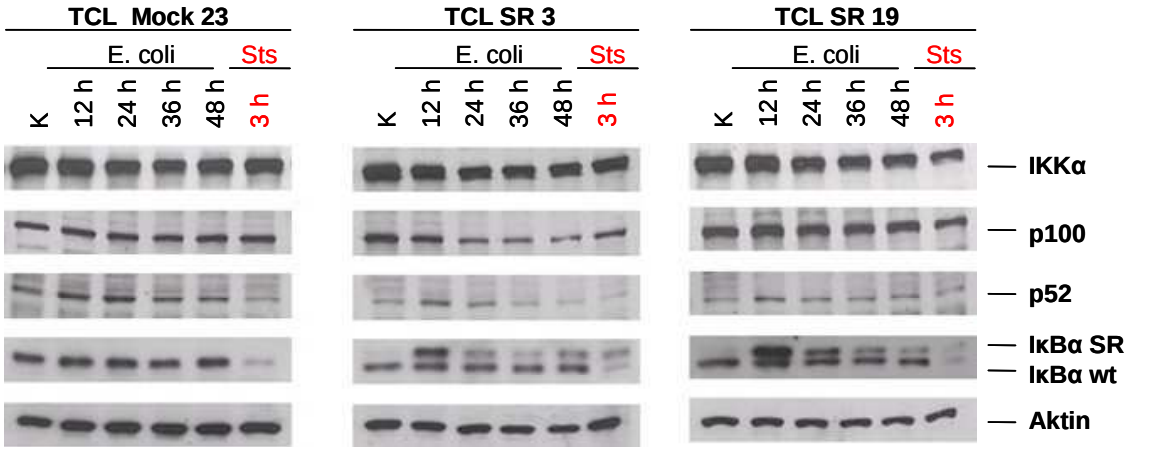


Abb.6 *Western Blots zum Einfluss bakterieller Phagozytose auf den NF-κB (nukleärer Faktor kappa B)-Signalweg im Gesamtzellxtrakt (TCL). Die angegebenen Zeitintervalle geben die Zeit nach Phagozytose von E.coli Top10 für eine Stunde an. Als Kontrolle für eine Apoptose wurde die Stimulation mit Staurosporin (Sts) für 3 h herangezogen. Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, IκBαSR = IκBα-Superrepressor, IκBαwt = endogenes IκBα, IKK: Inhibitorische kappa B Kinase.*

Auch die Expression von JNK1 und JNK2 im Gesamtzellextrakt von Mock- und SR-Zellen erscheint im Western Blot konstant (s. Abb. 7). Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich weder bei den Mock- noch bei den SR-Zellen ein Anstieg der Expression dieser beiden Proteine nach Phagozytose von E.coli. Auch ist kein Unterschied der Expression von JNK1 und JNK2 zwischen Mock-Zellen und den Zellen mit Superrepressor erkennbar.

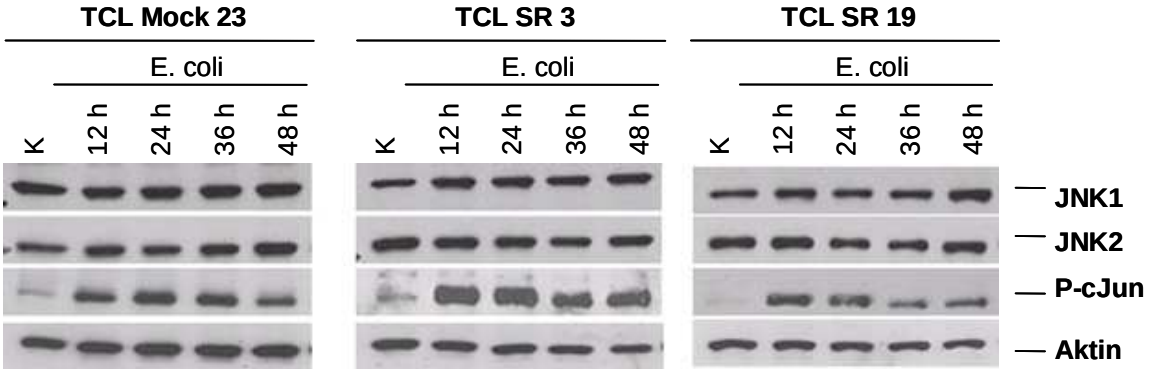


Abb. 7 *Western Blots zum Einfluss bakterieller Phagozytose auf den JNK-Signalweg im Gesamtzellxtrakt (TCL) von Mock- und SR- Makrophagen. Die angegebenen Zeitintervalle geben die Zeit nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) Top10 für eine Stunde an. Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, JNK: c-Jun-NH2-terminale Kinase, p-cJun: phosphoryliertes c-Jun.*

Im Western Blot des Gesamtzellextraktes (s. Abb. 7) ist eine deutliche Zunahme von phosphoryliertem c-Jun (p-cJun) sowohl in den Mock-Zellen als auch in den SR-Zellen 12 h nach Phagozytose von E.coli festzustellen. Die Menge an phosphoryliertem c-Jun bleibt dabei sowohl in den Mock-Makrophagen als auch in den SR-Zellen über einen Zeitraum von 48 h nach Phagozytose von E.coli nahezu konstant.

4.3 Auswirkungen der NF-κB-Suppression auf den Zelltod nach Phagozytose von E.coli

4.3.1 Zellzyklusanalyse

Beobachtungen während der Kultivierung von SR- und Mock-Makrophagen zeigen, dass SR-Zellen im Gegensatz zu den Mock-Zellen unter Ruhebedingungen vermehrt tote Zellen aufweisen.

Auch nach der einstündigen Phagozytose von E.coli wurden Unterschiede im Zelltod zwischen NF-κB-supprimierten Zellen und Mock-Makrophagen festgestellt.

Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse im FACS nach Ethanolfixation und Propidiumiodidfärbung wurden Unterschiede in der Anzahl toter Zellen 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Phagozytose von E.coli untersucht.

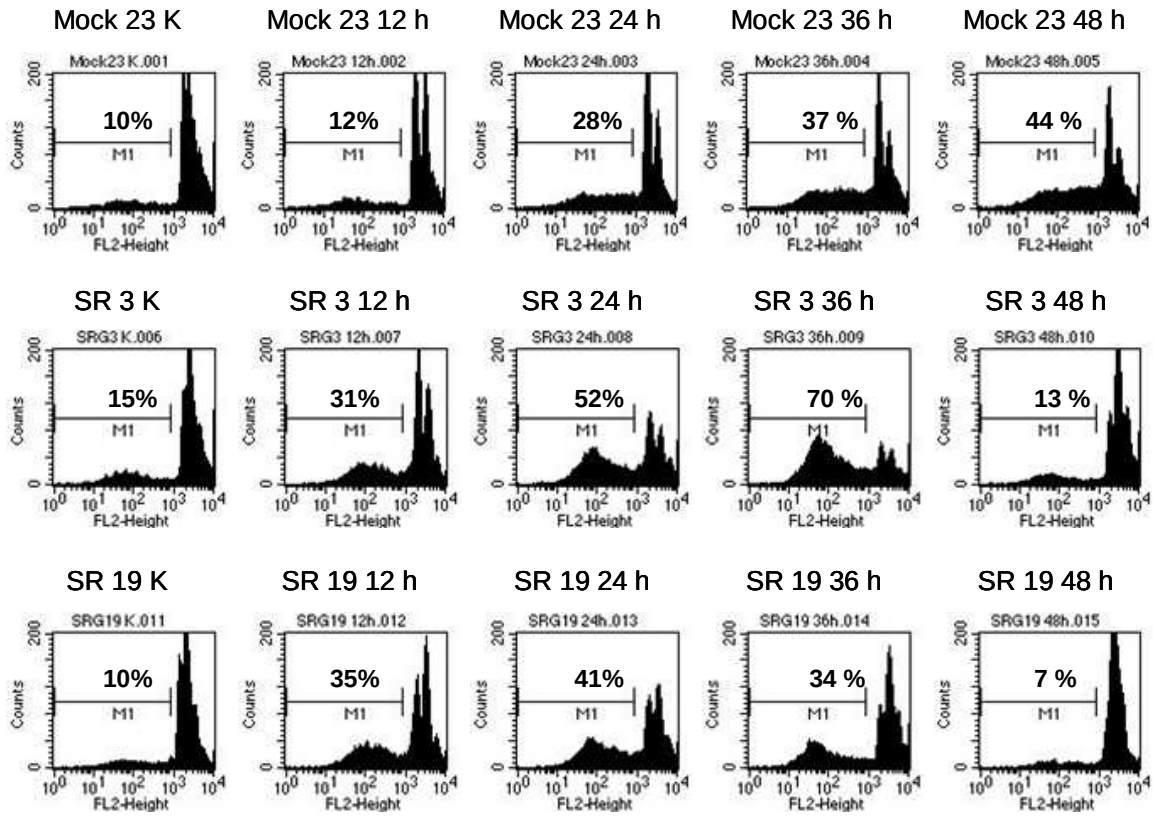


Abb. 8 *Zelltod nach Phagozytose von E.coli Top10 in einer repäsentativen Zellzyklusanalyse. Die Fl_2 (Fluoreszenz 2)-Intensität im FACS („Fluorescens Activated Cell Sorting") von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Ethanolfixation und PI-Färbung analysiert. Die in M1 abgegrenzten hypochromen Zellen wurden als tote Zellen gewertet. Die Errechnung und Auswertung wurden mit Hilfe der CellQuest Software von BD durchgeführt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Die in Abbildung 8 dargestellte repräsentative Messung hypochromer Zellen zeigt, dass bei den Mock-Zellen im Vergleich zu den SR-Zellen 12 h nach der Phagozytose von E.coli ein deutlich geringerer prozentualer Anteil hypochromer Zellen vorliegt. So beträgt dieser Anteil für die Mock-Zellen etwa 12 %, während für die SR 3-Makrophagen 31 % und die SR 19-Makrophagen 35 % hypochrome Zellen ermittelt wurden. Nach 24 h zeigen sich zwischen den Mock 23- und den SR-Makrophagen ähnliche prozentuale Verhältnisse. Die SR 3-Zellen weisen mit 52 % einen fast doppelt so hohen Prozentsatz an hypochromen Zellen auf wie die Mock 23-Makrophagen (28 %). Bei den SR 19-Makrophagen liegt der prozentuale Anteil mit 41 % nach 24 h etwas niedriger als bei den SR 3-Zellen. Nach 36 h zeigt sich bei den Mock 23- und den SR 3-Zellen eine weitere Zunahme des Anteils hypochromer Zellen. Die SR 19-Zellen hingegen scheinen zum Zeitpunkt 36 h

bereits mit einer Regeneration begonnen zu haben. Besonders deutlich wird dieses nach weiteren 12 h. Beide SR-Zellklone zeigen eine eindeutige Abnahme des prozentualen Anteils hypochromer Zellen (SR 3-Makrophagen 13 %, SR 19-Makrophagen 7 %). Im Gegensatz dazu scheinen die Mock-Zellen auch 48 h nach der Phagozytose von E.coli noch nicht mit einer Regeneration begonnen zu haben. So liegt der ermittelte Prozentsatz hypochromer Zellen nach dieser Zeitspanne bei 44 % (vgl. Abb. 8).

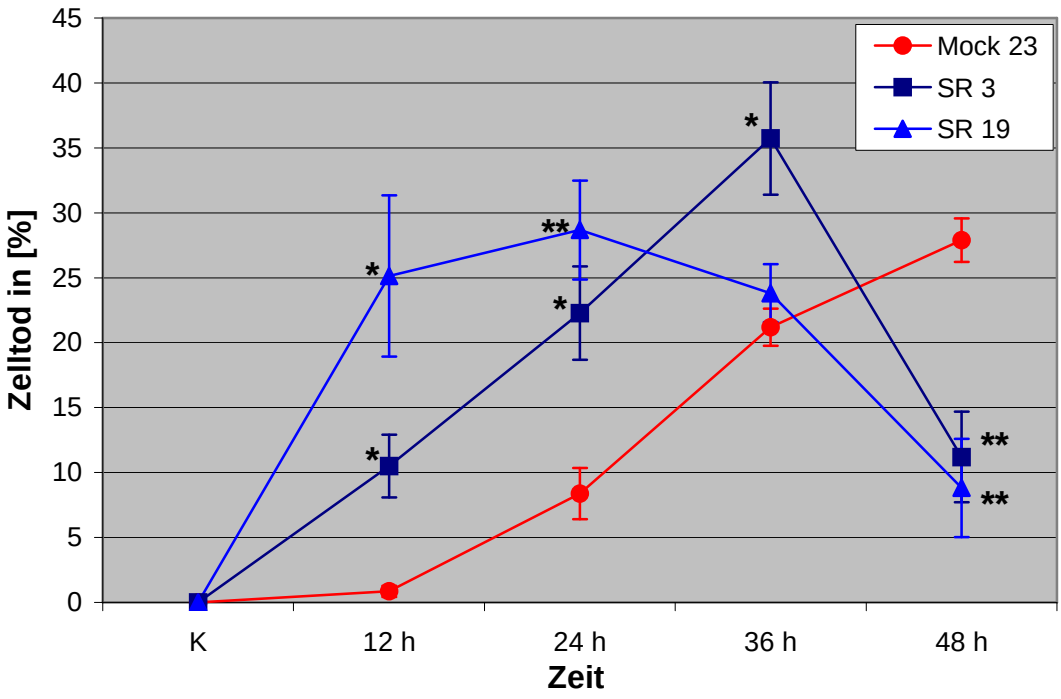


Abb. 9 *Zelltod von NF-κB (nukleärer Faktor kappa B) inhibierten und nicht-inhibierten Makrophagen nach Phagozytose von E.coli Top10. Dargestellt sind Mittelwerte der Fraktion toter Zellen aus mehreren Zellzyklusanalysen von Raw 264.7-Makrophagen im FACS („Fluorescens Activated Cell Sorting“). Anzahl unabhängiger Wiederholungsmessungen: Mock 23 neun Wiederholungsmessungen, SR-Klone je sieben Wiederholungsmessungen. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Student's t-test, verglichen wurden die Kontrollzellen Mock mit dem SR-Klon 3 und -19. Signifikanz wird angenommen für p<0,05, die Bezeichnung * steht für p<0,05, ** für p<0,001. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Die in Abbildung 9 dargestellte Auswertung von Wiederholungsmessungen des Zellzyklus bestätigt diese Ergebnisse. Dabei sind die Mittelwerte aus sieben bis neun unabhängigen Wiederholungen aufgetragen.

Mock 23-Makrophagen zeigen im Mittelwert 12 h nach Phagozytose von E.coli einen Anteil hypochromer Zellen von etwa 1 %. Im Gegensatz dazu zeigen

SR-Zellen zu diesem Zeitpunkt mit ca. 10 % (SR 3-Makrophagen) und ca. 25 % (SR 19-Makrophagen) einen deutlich höheren Prozentsatz hypochromer Zellen. Eine ähnliche Situation findet man auch weitere 12 h später: Bei den Mock-Zellen lassen sich im Mittel 8 % hypochrome Zellen messen, bei den SR-Zellen liegt diese Prozentzahl für den Klon 3 bei etwa 22 % und für den Klon 19 bei ca. 29 %.

36 h nach der Phagozytose von E.coli nimmt der prozentuale Anteil hypochromer Zellen für Mock-Makrophagen weiter auf 21 % zu. Der Prozentsatz hypochromer toter Zellen nimmt auch bei den SR 3-Makrophagen zu, bis zu einem Maximum von ca. 36 %. Die SR 19-Makrophagen hingegen scheinen zu diesem Zeitpunkt bereits mit einer Regeneration zu beginnen, so liegt der Anteil an hyopchromen Zellen im Mittel nur noch bei etwa 24 %. Nach 48 h lässt sich eine Regeneration der Zellen neben dem Klon 19 auch bei dem Klon 3 feststellen. Der Anteil toter Zellen liegt bei etwa 9 % (SR 3) und 11 % (SR 19). Die Mock 23-Kontrollzellen hingegen sterben weiter und erreichen im Mittelwert nach 48 h einen Anteil hypochromer Zellen von 28 %.

Die Betrachtung mehrerer Messungen der Zellzyklusanalyse führt zu dem Ergebnis, dass Makrophagen mit Suppression der klassischen NF-κB-Aktivierung nach der Phagozytose von E.coli im Vergleich mit Kontrollzellen zunächst deutlich stärker sterben, sich dann aber nach etwa 36 h regenerieren, während Mock-Zellen ihr Sterben fortsetzen.

Diese Befunde sind konsistent mit den Ergebnissen aus der Trypanblaufärbung.

4.3.2 Trypanblaufärbung

Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte der Einzelzählungen toter Mock 23-, SR 3- und SR 19-Zellen nach Färbung mit Trypanblau. Insgesamt ergaben sich mit dieser Methode ähnliche Ergebnisse wie die unter 4.3.1 dargestellte Zellzyklusanalyse.

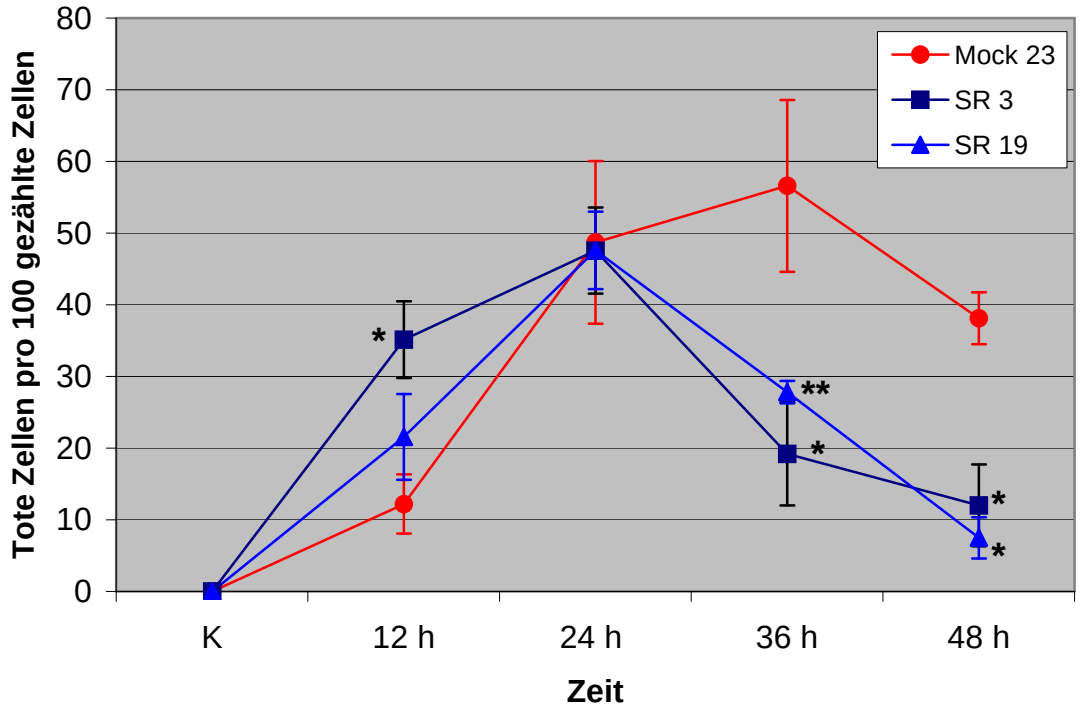


Abb. 10 *Zelltod von NF-κB (nukleärer Faktor kappa B) inhibierten und nicht-inhibierten Makrophagen nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) Top10. Dargestellt sind Mittelwerte der Fraktion toter Zellen aus Trypanblaufärbungen von Raw 264.7-Makrophagen. Anzahl unabhängiger Wiederholungsmessungen: Mock 23 drei Wiederholungsmessungen, SR 3 und SR 19-Klon vier Wiederholungsmessungen. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Student's t-test, verglichen wurden die Kontrollzellen Mock mit dem SR-Klon 3 und -19. Signifikanz wird angenommen für p<0,05, die Bezeichnung * steht für p<0,05, ** steht für p<0,001. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Während Mock-Zellen nach 12 h nur eine leichte Zunahme der Anzahl toter Zellen zeigen und erst nach 36 h das Maximum toter Zellen erreicht ist (ca. 60 % tote Zellen), ist bei den SR-Zellen bereits 12 h nach Phagozytose von E.coli eine deutliche Zunahme toter Zellen gegenüber der Kontrollpopulation unstimulierter Zellen zu verzeichnen und die meisten toten Zellen finden sich bei beiden SR-Klonen 24 h nach der Phagozytose von E.coli.

Im Vergleich der Mittelwerte von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen zeigt sich auch in der Trypanblaufärbung, dass die SR-Zellen zu früheren Zeitpunkten stärker sterben als die Mock-Zellen. Nach 36 h und 48 h jedoch reduziert sich die Anzahl toter Zellen für beide SR-Klone deutlich, während diese für die Mock-Zellen 36 h nach Phagozytose von E.coli sogar noch zunimmt. Nach 48 h beginnen auch die Mock-Zellen sich zu erholen. Diese Reduktion der Zahl

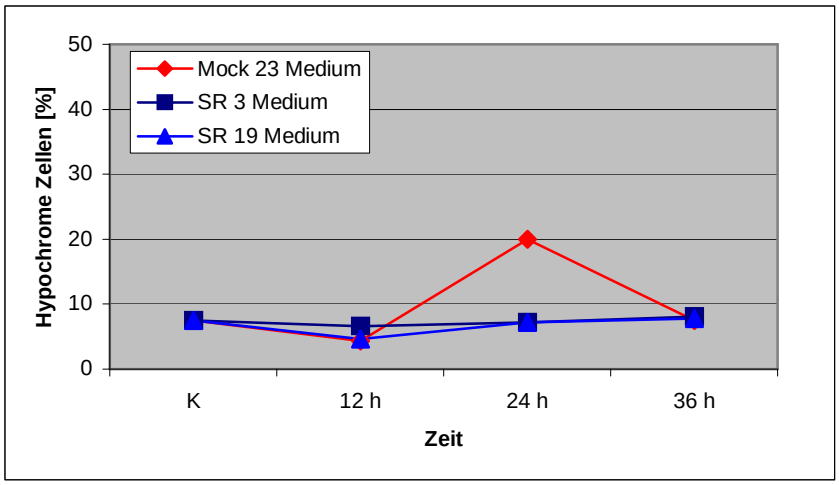
toter Zellen ist im Vergleich zu den NF-κB-supprimierten Zellen allerdings geringer.

4.4 Unterscheidung zwischen exogenen und endogenen Mechanismen

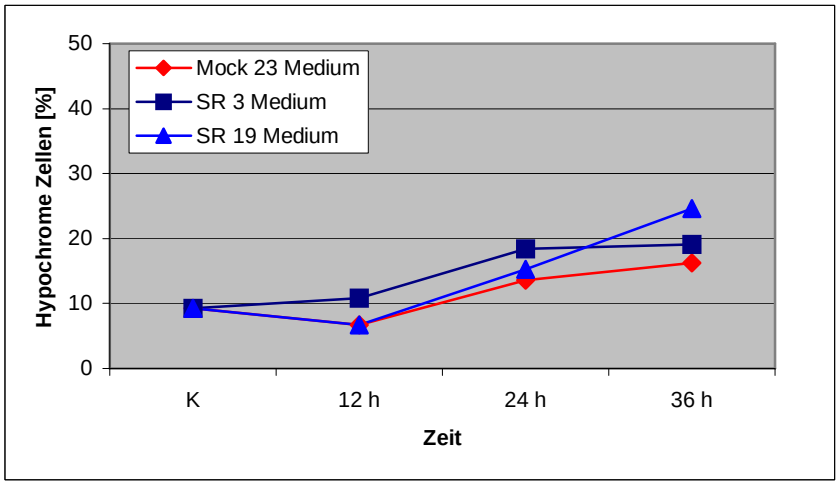
Um herauszufinden, ob die Beobachtungen zum Zelltod von Makrophagen auf endogene, biochemische Mechanismen zurückzuführen sind oder auf exogenen Faktoren, wie beispielsweise von den Zellen produzierten und ins Zellmedium ausgeschütteten Mediatoren, beruhen, wurden eine Stimulationsreihe und Zellzyklus-Messung mit sterilfiltriertem, 24 h lang konditioniertem Medium von mit E.coli (1 h) stimulierten SR- und Mock-Zellen durchgeführt.

Die in Abbildung 11 dargestellte repräsentative Messung zeigt, dass für Mock-Zellen sowohl 12 h, 24 h als auch 36 h nach Zugabe von 24 h-konditioniertem Medium keine bemerkenswerte Zunahme des prozentualen Anteils an hypochromen Zellen vorliegt. Dies trifft sowohl für die Verwendung von konditioniertem Medium aus Mock 23- als auch aus SR 3- und SR 19-Makrophagen zu. Die Zunahme hypochromer Mock 23-Makrophagen 24 h nach Zugabe von konditioniertem Medium (Abb. 11A) stellt eine ungerichtete Beobachtung dar, die in nachfolgenden Messungen zu einzelnen Zeitpunkten ebenfalls nachweisbar waren. Ein partieller Einfluss sezernierter Mediatoren auf das Ausmaß des Zelltodes liegt somit nahe.

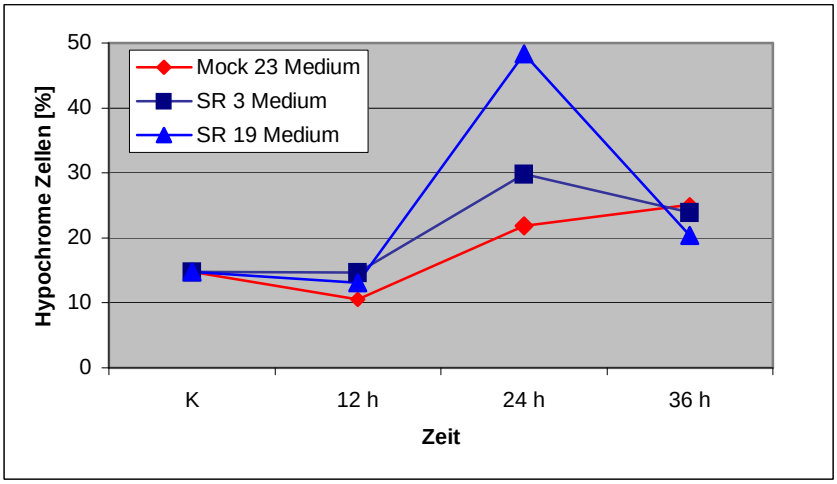
Ähnliche Ergebnisse waren auch für SR 3- und SR 19-Makrophagen zu erhalten. Auch hier zeigt die Zugabe von konditioniertem Medium vor allem im Klon 3 keine bemerkenswerten Anstiege des Prozentsatzes hypochromer Zellen. Die Zellzyklusanalyse für die SR 19-Zellen zeigt nach 24 h und 36 h einen Anstieg der Prozentzahl hypochromer Zellen. Auch dieser Anstieg war in Wiederholungsmessungen inkonstant nachweisbar, zeigt aber auch hier einen partiellen Einfluss des Mediums an.



A



B



C

Abb. 11 *Zelltod von Mock 23- (Abb. 11A), SR 3-(Abb. 11B) und SR 19-(Abb. 11C) Makrophagen nach Inkubation mit konditioniertem Medium. Prozentzahl hypochromer Makrophagen in der Zellzyklusanalyse. Die angegebenen Zeitpunkte entsprechen den Zeitintervallen nach Zugabe von 24 h-konditioniertem Medium von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

4.5 Phänotypisches Aussehen von Mock- und SR-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli

Um die unter 4.3 dargestellten Unterschiede im Sterbeverhalten zwischen Mock-Makrophagen und Makrophagen mit NF-κB-Supression genauer analysieren und die Art des Zelltodes klassifizieren zu können, wurde zunächst das phänotypische Aussehen des Zelltods betrachtet (Abb. 12). Hierzu wurden mikroskopische Aufnahmen E.coli-stimulierter Zellen gemacht.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede im mikroskopischen Aussehen von transfizierten Mock- und SR-Raw 264.7-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli.

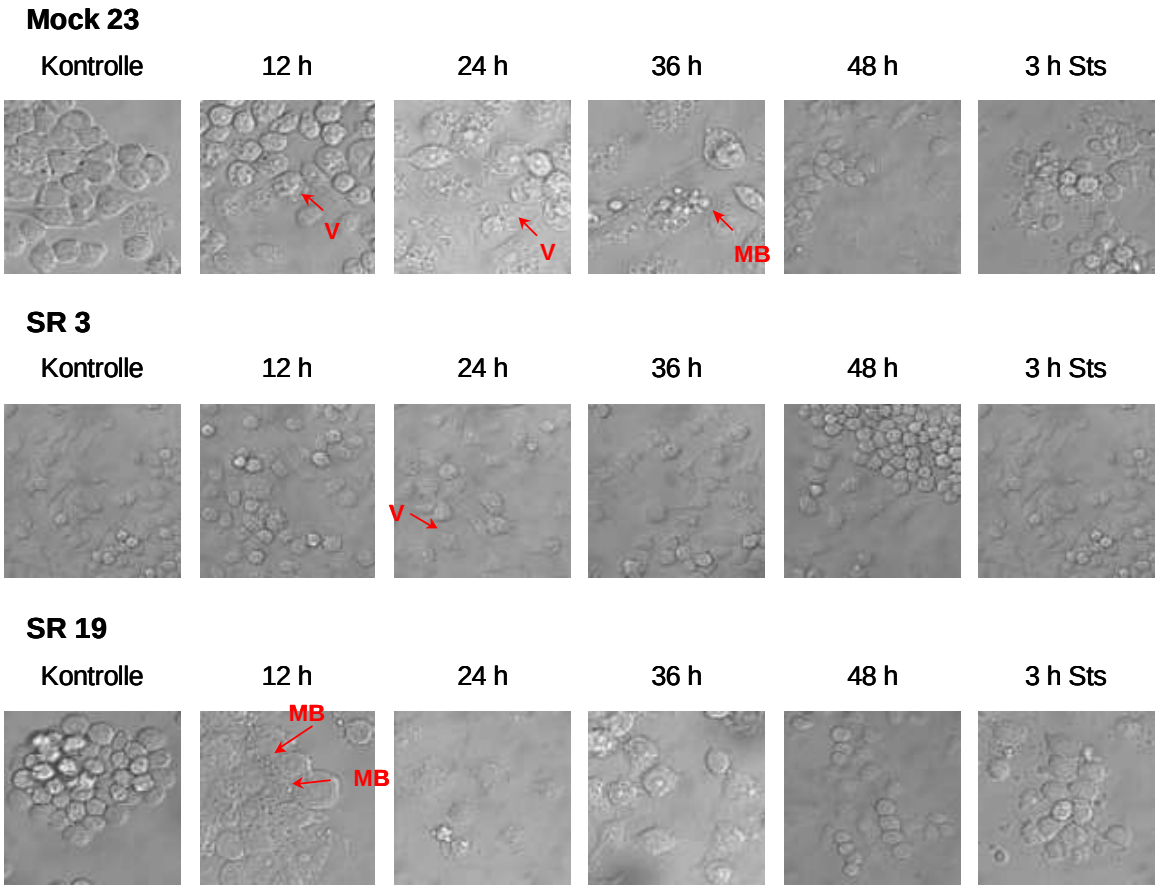


Abb. 12 *Morphologisches Aussehen von Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen zu angegebenen Zeitpunkten nach Phagozytose von E.coli, sowie nach dreistündiger Stimulation mit Staurosporin (Sts). Zu beachten sind besonders die Ausbildung großer Vakuolen (V) sowie die Bildung typischer „Membrane Blebs" (MB). SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen)*

Bereits 12 h nach der Phagozytose von E.coli verlieren Mock 23-Makrophagen ihr gleichmäßig strukturiertes und rundes Aussehen und weisen deutliche Vakuolisierungen des Zytoplasmas auf (s. Abb. 12; Mock 23). Typische Apoptosezeichen wie Membranausstülpungen und Zellschrumpfung, die nach 3 h Stimulation mit Staurosporin zu beobachten sind, lassen sich dabei nicht erkennen. Im Gegenteil erscheinen die Mock 23-Makrophagen sogar geschwollen und vergrößert.

Die Vakuolisierungen des Zytoplasmas haben sich weitere 12 h nach Phagozytose von E.coli deutlich verstärkt. So lassen sich mikroskopisch fast ausschließlich Zellen erkennen, die Vakuolisierungen des Zytoplasmas aufweisen. Zusätzlich haben sich die Vakuolen so vergrößert, dass teilweise nur wenige Vakuolen eine einzige Zelle ausfüllen. Typische Zeichen der Apoptose sind weiterhin nicht nachweisbar.

36 h nach der Phagozytose von E.coli beginnen sich die zuvor vakuolisierten Zellen aufzulösen. Gleichzeitig bilden einige Zellen apoptose-typische Zeichen aus, wie zum Beispiel das „Membrane Blebbing“ (s. Abb. 12; Mock 23 MB). Weitere 12 h später erkennt man immer noch Reste von toten vakuolisierten Zellen. Zwischen diesen sich auflösenden Zellen scheinen wenige Mock 23-Zellen zu überleben.

Bei den SR-Makrophagen löst die Phagozytose von E.coli ein etwas anderes Bild aus (s. Abb. 12; SR 3 und SR 19). 12 h nach der Phagozytose von E.coli weisen die SR-Makrophagen im Vergleich zu den Mock-Makrophagen eher kleine Vakuolisierungen des Zytoplasmas auf. Die Zahl dieser Vakuolisierungen ist im Gegensatz zu den Mock-Zellen deutlich höher. Vor allem der SR-Klon 19 zeigt 12 h nach der Phagozytose von E.coli Apoptosezeichen. „Membrane Blebs“ sind eindeutig zu erkennen (vgl. Abb. 12; SR 19).

Auch 24 h nach Phagozytose von E.coli bilden sich im Zytoplasma der Makrophagen nur kleine Vakuolen. Einige der Zellen weisen deutliche Ausläufer auf. Die Apoptosezeichen sind nicht mehr erkennbar.

Nach weiteren 12 h lösen sich, wie bei den Mock-Makrophagen, die vakuolisierten Zellen auf und sterben. Bereits zu diesem Zeitpunkt scheinen sich einige SR-Zellen zu erholen. Dieser Eindruck verstärkt sich 48 h Stunden nach Phagozytose von E.coli.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mock-Makrophagen im Vergleich zu den SR-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli deutlich größere, dafür allerdings weniger Vakuolen im Zytoplasma bilden. Apoptosezeichen lassen sich bei den Mock 23-Zellen erst nach 36 h finden, vor allem der SR-Klon 19 weist aber bereits 12 h nach Phagozytose von E.coli mikroskopisch eindeutige Apoptosezeichen auf. 36 h und 48 h nach Phagozytose von E.coli scheinen sich die SR-Makrophagen auch phänotypisch im Vergleich zu den Mock-Makrophagen besser zu erholen und schneller wieder mit einer Proliferation zu beginnen.

4.6 Untersuchungen zur Art des Zelltods nach Phagozytose von E.coli

In den mikroskopischen Aufnahmen von stimulierten Mock- und SR-Zellen finden sich Hinweise auf verschiedene Arten des programmierten Zelltods. Die vor allem nach 12 h bei SR-Zellen zu beobachtenden „Membrane Blebs“ (vgl Abb. 12; SR 3 und SR 19) lassen es möglich erscheinen, dass die Zellen einer klassischen Apoptose unterliegen. Die in den Mock-Makrophagen auffälligen Vakuolen hingegen erinnern eher an die für die Autophagozytose bekannten Vakuolen. Daher wurden weitere typische Merkmale der Apoptose und Autophagozytose untersucht.

4.6.1 DNA-Fragmentierung

Typischerweise geht Apoptose mit einer charakteristischen 200bp-Fragmentierung der DNA ein. Daher wurde die DNA-Fragmentierung sowohl mit Hilfe der Nicoletti-Färbung im FACS als auch durch die Auftrennung genomischer DNA aus stimulierten Mock- und SR-Makrophagen untersucht.

4.6.1.1 Auftrennung genomischer DNA

Die DNA-Fragmentierung bei Apoptose ergibt nach Auftrennung der genomischen DNA apoptotischer Zellen das charakteristische Bild der sogenannten DNA-Leitern (s. Abb. 13). Um überprüfen zu können, ob die verwendeten Raw 264.7-Makrophagen fähig sind, derartige DNA-Leitern zu bilden, und um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurden die Mock- und SR-Zellen zusätzlich zur Stimulation mit E.coli auch für 2 h bzw. 5 h mit dem typischen Apoptoseauslöser

Staurosporin stimuliert. Dieser Versuch wurde nur mit Mock 23 und dem SR-Klon 19 durchgeführt.

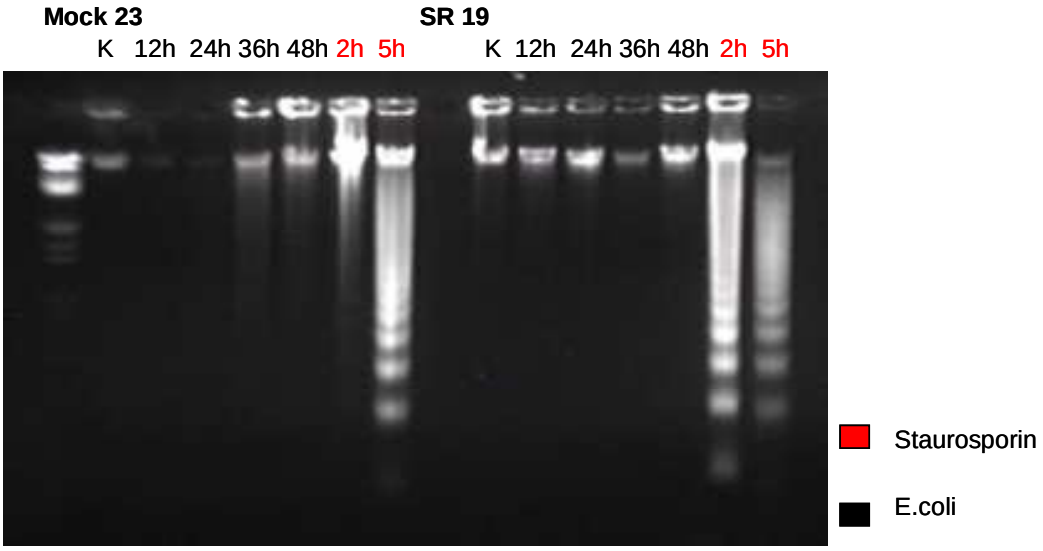


Abb. 13 *DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Fragmentierung in Mock 23- und SR 19-Makrophagen nach Inkubation mit Escherichia.coli (E.coli) und Staurosporin (rot). Nach den angegebenen Zeitintervallen wurde die genomische DNA aus den Makrophagen präpariert und anschließend gelelektrophoretisch getrennt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Es zeigt sich, dass nach der Stimulation mit Staurosporin für 2 h und 5 h eine apoptosetypische Degradierung der DNA erfolgt. Die Phagozytose von E.coli führt im Gegensatz dazu zu keiner Fragmentierung der DNA. Sowohl die Mock- als auch die SR-Makrophagen unterliegen demnach einem Zelltod, der nicht mit der für die Apoptose typischen DNA-Fragmentierung einhergeht.

4.6.1.2 Nicoletti-Färbung

Abbildung 14 zeigt die Färbung nach Nicoletti mit Kernen lysierter Zellen. Dabei wurden sterbende Zellen mit Propidiumiodid markiert, deren DNA aufgrund von Degeneration hypochrom geworden ist. Im Unterschied zur Zellzyklusanalyse, bei der ganze Zellen mit PI gefärbt werden, erfolgt bei der Färbung nach Nicoletti nur die Messung von Kernen.

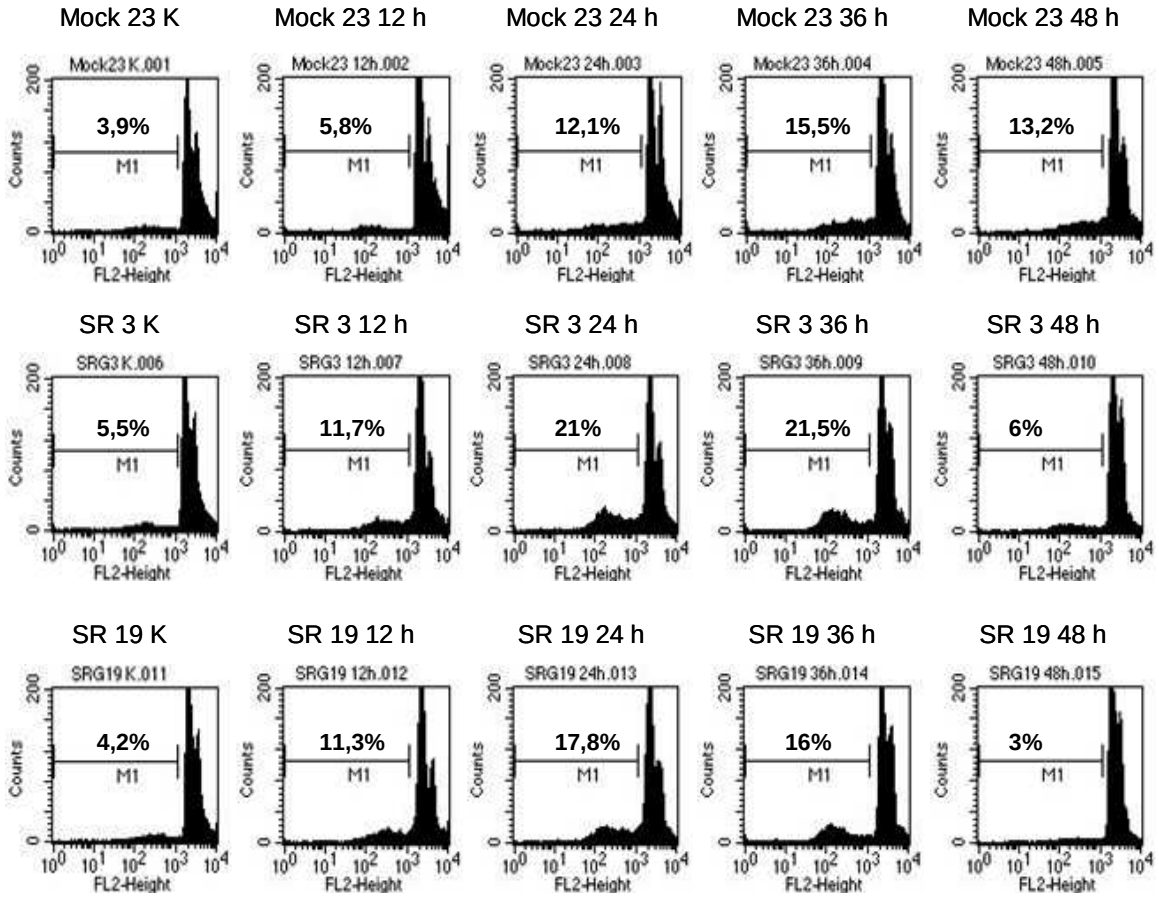


Abb. 14 *Zelltod in der Nicoletti-Färbung nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) Top10. Die Raw 264.7-Makrophagen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und die erhaltenen Kerne nach PI (Propidiumiodid)-Färbung im FACS („Fluorescens Activated Cell Sorting") analysiert. Die in M1 markierten hypochromen Zellen wurden als apoptotische Zellen gewertet, deren PI-Intensität in Fluoreszenz2 geringer ist als die von G1- Zellen. Die Errechnung und Auswertung wurden mit Hilfe der CellQuest Software von BD durchgeführt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Die in Abbildung 14 dargestellte repräsentative Messung der Nicolettifärbung zeigt für die Mock 23-Makrophagen eine geringe Zunahme apoptotischer Zellen während des 48-stündigen Zeitintervalls nach Phagozytose von E.coli. In der Kontrollpopulation wurde ein Prozentanteil von etwa 3,9 % apoptotischen Zellen ermittelt. Dieser Anteil steigt konstant bis zum Zeitpunkt 36 h auf 15,5 % an. 48 h nach Phagozytose von E.coli wurden 13,2 % apoptotische Zellen gemessen. Für die beiden SR-Klone wurde ein anderer Messverlauf beobachtet. Die Kontrollpopulationen beider Klone weisen zwar unter Ruhebedingungen einen ähnlichen Anteil apoptotischer Zellen wie die Mock-Zellen auf (5,5 % bei SR 3-Makrophagen und 4,2 % bei SR 19-Makrophagen). 12 h nach Phagozytose von

E.coli ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen hingegen bereits auf etwa 11,5 % angestiegen (SR 3-Zellen 11,7 %, SR 19-Zellen 11,3 %). Nach 24 h sind in den SR 19-Makrophagen 17,8 % Zellen apoptotisch. In den SR 3-Makrophagen ist der maximale Anteil apoptotischer Zellen nach 36 h zu sehen (21,5 %). Nach 48 h haben sich sowohl die SR 3- als auch die SR 19-Makrophagen erholt, so dass der Anteil apoptotischer Zellen bei 6 % (SR 3-Zellen) bzw. 3 % (SR 19-Zellen) liegt.

Vergleicht man die drei Zelllinien miteinander, entspricht der beschriebene Verlauf des Zelltods nach Phagozytose von E.coli dem bereits in der Trypanblaufärbung und der Zellzyklusanalyse beobachteten. Im Unterschied zu diesen beiden Methoden sind allerdings die mit Nicolettifärbung ermittelten Prozentwerte apoptotischer Zellen deutlich geringer.

4.6.2 Western Blots mit Apoptose-relevanten Proteinen

4.6.2.1 Caspase 3

Für die Apoptose ist eine Aktivierung von Caspasen typisch. Dabei kommt besonders der Caspase 3 als einer der End-Caspasen im Signalweg der Caspaseaktivierung eine Schlüsselrolle zu. Für die Untersuchung der Expression und Spaltung der Procaspase 3 wurden die Zellen neben E.coli-Stimulation (1 h) zusätzlich 3 h mit Staurosporin als Positivkontrolle behandelt.

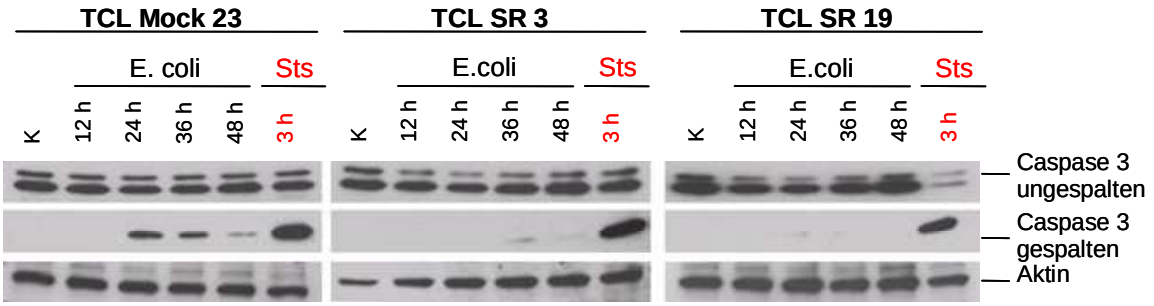


Abb. 15 *Expression und Aktivierung von Caspase 3 im Gesamtzellextrakt (TCL) aus Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) und Stimulation mit Staurosporin (Sts, rot gekennzeichnet). Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

In Mock 23-Makrophagen findet 24 h, 36 h und 48 h nach Phagozytose von E.coli eine Spaltung von Caspase 3 statt (s. Abb. 15). Dabei scheint die Menge an

gespaltener Caspase 3 nach 24 h am größten zu sein. Im Vergleich zur Caspasespaltung nach Stimulation mit Staurosporin 3 h jedoch erscheint die beobachtete Caspasespaltung nach Phagozytose von E.coli gering. Die SR-Zellen zeigen keine Spaltung der Caspase 3 nach Phagozytose von E.coli. Mit Staurosporin läßt sich jedoch eine Spaltung von Caspase 3 auslösen. Die Mengen der nach Stimulation mit Staurosporin gespaltenen Caspase 3 sind in Mock- und SR-Makrophagen vergleichbar.

4.6.2.2 CIAP2, Bax und CD95-Ligand

Das anti-apoptotische Protein cIAP2 zeigt im untersuchten Zeitraum nach der Phagozytose von E.coli keine Veränderungen seiner Expression (s. Abb. 16). Auch der Vergleich zwischen Mock- und SR-Zellen lässt keine Unterschiede in der Expression erkennen.

Der CD95-Ligand aus der TNF-Superfamilie ist ein Bestandteil des extrinsischen Signalwegs der Apoptose nach Stimulation von Todesrezeptoren. Wie Abbildung 16 zeigt, wird der CD95-Ligand von Mock- und SR-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli und Stimulation mit Staurosporin nicht verändert exprimiert.

Das klassische pro-apoptotische Protein Bax zeigt in den Mock- und SR-Zellen ebenfalls keine veränderte Expression infolge der Phagozytose von E.coli.

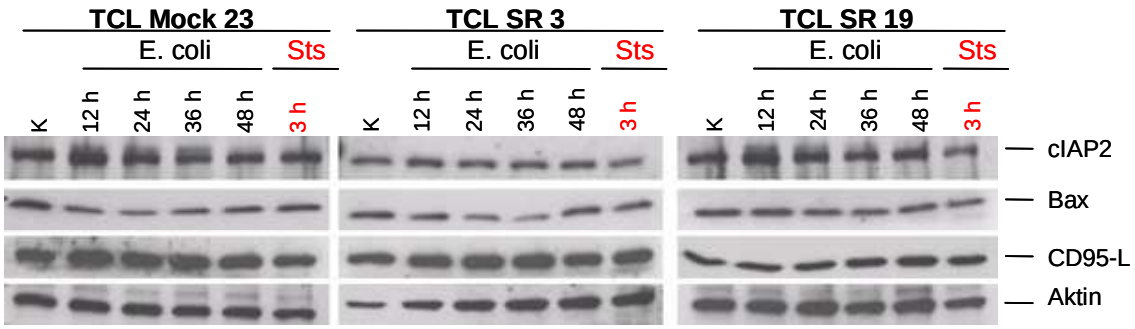


Abb. 16 *Western Blots mit Antikörper gegen cIAP2, Bax und CD95-Ligand (CD95-L) im Gesamtzellextrakt (TCL) aus Mock 23-, SR 3-, SR 19-Makrophagen nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) und Stimulation mit Staurosporin (Sts, rot gekennzeichnet). Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, cIAP: „c-linked inhibitor of apoptosis protein“, Bax: Bcl-2-associated-X protein“.*

4.6.2.3 RNA-Protection-Assay (RPA)

Abbildung 17 zeigt den RNA-Protection-Assay mit einem Templat gegen ausgewählte Apoptoseproteine (Bclw, Bfl1, Bcl-x L/S, Bak, Bax und Bad).

L32 und GAPDH dienen dabei als interne Kontrolle. Betrachtet man die Intensität der einzelnen Banden bezogen auf die jeweilige interne Kontrolle, kann man für keines der untersuchten Apoptoseproteine eine bedeutende Veränderung beobachten.

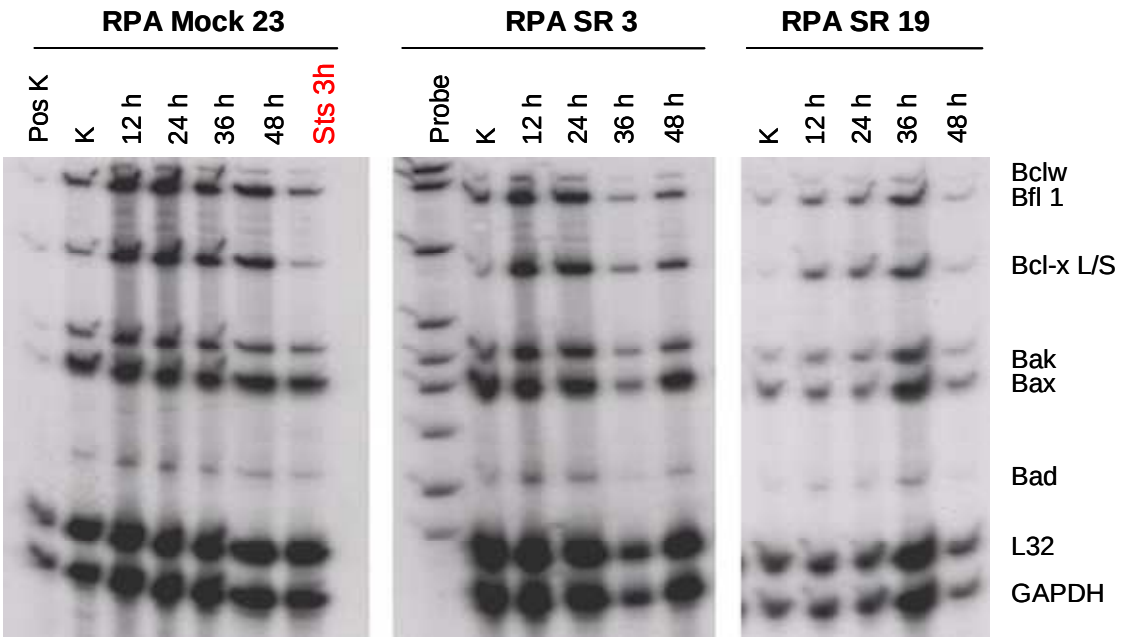


Abb. 17 *RNA (Ribonukleinsäure)-Protection-Assay (RPA) mit einem Template gegen ausgewählte Apoptoseproteine (Apo2, BD) mit RNA aus Mock 23-, SR 3- und SR 19-Makrophagen nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) für die angegebenen Zeitintervalle und die Stimulation mit Staurosporin (Sts, rot gekennzeichnet) für 3 h. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, Pos K: Positiv Kontrolle, Bfl: antiapoptotisches Bcl-2 homologes Protein (Synonym A1), Bcl: „B-cell leukaemia/lymphoma related protein“, Bak: „Bcl-2-antagonist/killer“, Bax: „Bcl-2-associated-X protein, Bad: „Bcl-2-antagonist of cell death“, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase.*

4.6.3 Autophagozytose, Charakterisierung von Vakuolen

Da eine klassische Apoptose als dominierender Mechanismus für den beobachteten Zelltod auszuschließen ist, wurden charakteristische Zeichen der Autophagozytose untersucht. Hierzu zählt unter anderem die Ausbildung von Autophagosomen.

4.6.3.1 Färbung mit Monodansylcadaverin

Um herauszufinden, ob NF-κB-Suppression den Mechanismus der Autophagozytose beeinflusst, wurden die beobachteten Vakuolen nach E.coli-Phagozytose in Mock- und SR-Zellen genauer untersucht. Autophagozytotische Autophagosomen lassen sich mit Monodansylcadaverin (MDC) anfärben.

3-Methyladenin (3-MA) hemmt spezifisch die Autophagozytose. Um zusätzlich zu überprüfen, ob die nach Phagozytose von E.coli gebildeten Vakuolen tatsächlich durch Autophagozytose hervorgerufen sind, wurden die Zellen mit 3-MA coinkubiert und anschließend mit MDC gefärbt.

Abbildung 18 zeigt die Färbung mit MDC von Mock 23-Makrophagen sowie beispielhaft die Färbung von SR 19-Makrophagen sowohl ohne als auch mit Vorinkubation mit 3-MA. Da die beobachteten Unterschiede im Zelltod sowohl in der Zellzyklusanalyse (vgl. 4.3.1) als auch im phänotypischen Aussehen (vgl. 4.5) zum Zeitpunkt 24 h am deutlichsten ausgeprägt waren, wurde in diesem Experiment nur das Zeitintervall 24 h untersucht.

In den Mock 23-Makrophagen herrscht sowohl in der Kontrollpopulation unstimulierter Zellen als auch nach einstündiger Phagozytose und 24stündiger Beobachtung von E.coli eine gleichmäßige, diffuse Verteilung von MDC im Zytoplasma vor.

Die SR 19-Zellen zeigen ein deutlich anderes Bild (s. Abb. 18 unten). 24 h nach Phagozytose von E.coli lassen sich im Zytoplasma deutliche punktförmige Ansammlungen von MDC erkennen, die in der Kontrollfärbung von unstimulierten Zellen nicht vorhanden sind. Diese punktförmigen Anhäufungen von MDC befinden sich dabei im Bereich der phänotypisch zu beobachtenden Vakuolen und sind typisch für die Autophagozytose. Im Gegensatz zu den Mock 23-Makrophagen sind die Vakuolen der SR 19-Zellen also mit MDC anfärbbar.

Nach Zugabe des Autophagozytosehemmstoffes 3-Methyladenin (3-MA) ist in den Mock 23-Zellen keine Veränderung mehr zu beobachten. Weder in der Kontrollprobe noch nach 24-stündiger Phagozytose von E.coli lassen sich Vakuolen mit MDC anfärben. In den SR 19-Makrophagen jedoch ruft die gleichzeitige Inkubation mit 3-MA deutliche Veränderungen in der Anfärbbarkeit mit MDC hervor. 24 h nach Phagozytose von E.coli sind nach Koinkubation mit 3-

MA keine Vakuolen mehr mit MDC anfärbbar. Auch das phänotypische Bild weist deutlich weniger Vakuolen auf.

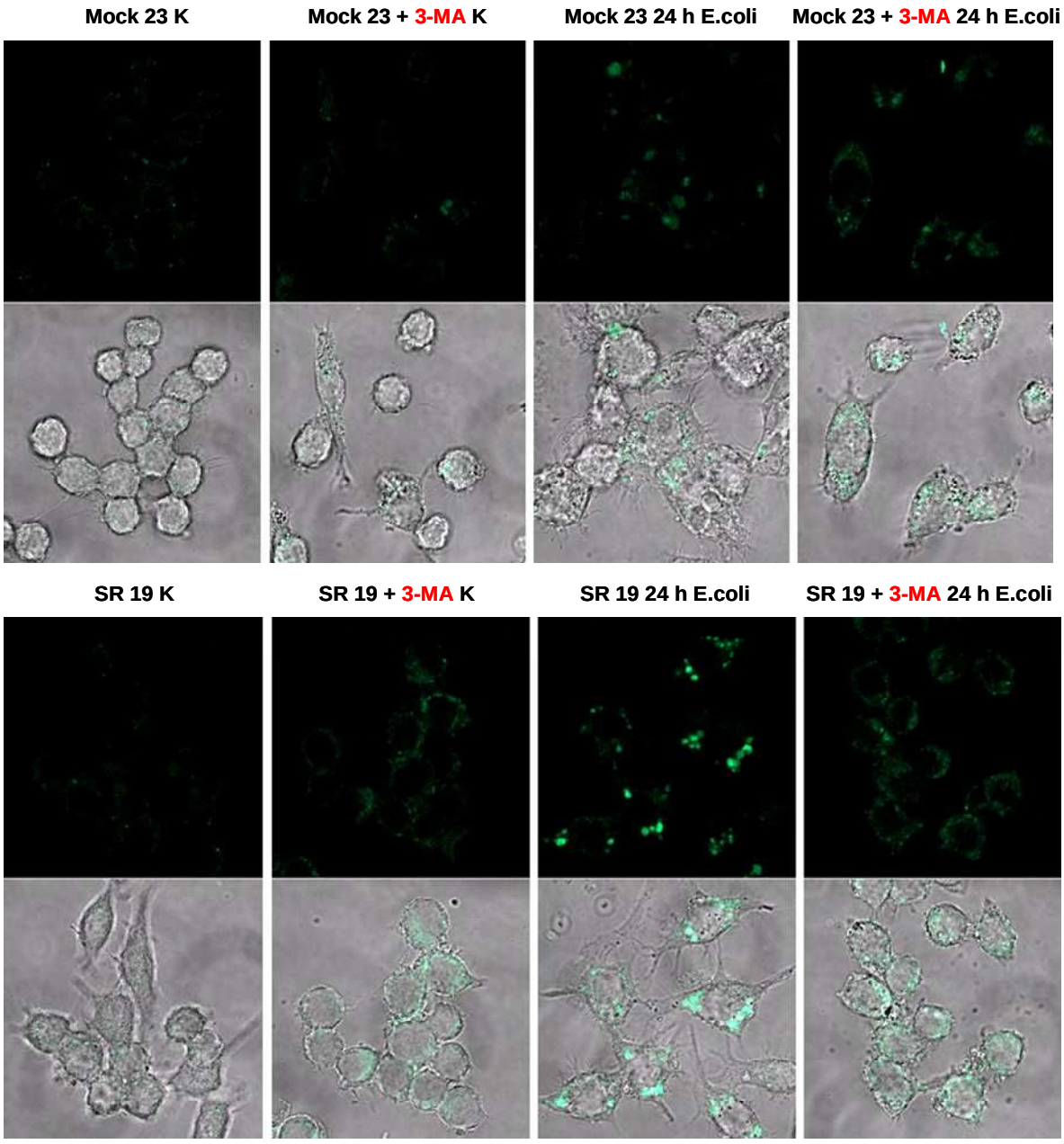


Abb. 18 *Färbung von Mock 23- und SR 19-Makrophagen mit Monodansylcadaverin (MDC) nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli). Rot markiert ist die Färbung mit MDC nach zusätzlicher Inkubation mit dem Autophagozytosehemmstoff 3-Methyladenin (3-MA). SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

Es ist also festzuhalten, dass sich 24 h nach einstündiger E.coli-Phagozytose in den SR 19-Zellen die gebildeten Vakuolen im Gegensatz zu den

Mock 23-Zellen deutlich mit MDC anfärben lassen, diese punktförmigen Ansammlungen von MDC in den SR 19-Makrophagen jedoch nach Koinkubation mit 3-MA nicht mehr zu beobachten sind.

4.6.3.2 PCR mit Autophagozytose-typischen Genen

Um zu überprüfen, ob die unter 4.6.3.1 beschriebenen Ergebnisse auch auf der Ebene autophagozytotischer Gene nachzuvollziehen sind, wurden Reverse Transkriptase-PCRs mit Primern für Atg5, Atg7 und Beclin 1 angefertigt (Abb. 19).

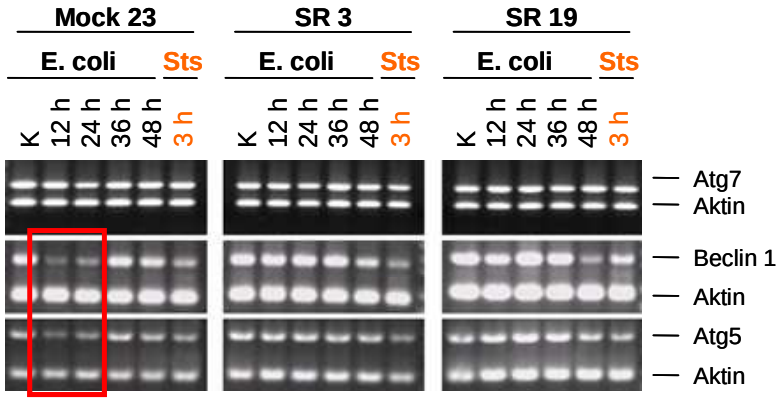


Abb. 19 *Reverse-Transkriptase-PCR (Polymerasekettenreaktion) ausgeführt mit DNA (Desoxyribonuklease) aus Mock 23-, SR 3- und SR 19- Makrophagen nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) für die angegebenen Zeitintervalle und Stimulation mit Staurosporin (Sts, rot gekennzeichnet) für 3 h. Die PCR wurde als Multiplex-PCR mit Aktin und Primern für Atg7, Atg5 und Beclin 1 durchgeführt. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen, Atg: „Autophagy related".*

Während die PCR für Atg7 keinerlei Unterschiede sowohl innerhalb einer Stimulationsreihe als auch zwischen Mock- und SR-Zellen aufweist, lassen sich für Beclin 1 und Atg5 interessante Beobachtungen machen. Während in den SR-Zellen im Verlauf der Stimulationsreihe keine bemerkenswerten Veränderungen auftreten, lässt sich in den Mock-Zellen nach 12 h und 24 h eine Abnahme von Autophagozytose- spezifischen Beclin 1 und Atg5 feststellen.

4.6.3.3 Western Blot mit Beclin 1-Antikörper

Um die mit der PCR gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen Beclin 1 durchgeführt (s. Abb. 20). Die Analyse des Gesamtzellextrakts stimulierter Mock- und SR-Makrophagen für Beclin 1 ergab im Western Blot ähnliche Ergebnisse wie die PCR. Während für

die Mock-Zellen eine leichte Abnahme des Beclins 1 bei 12 h bis 36 h nach der Phagozytose von E.coli zu sehen ist, bleibt die Expression von Beclin 1 in den SR-Zellen auch nach Stimulation mit E.coli konstant.

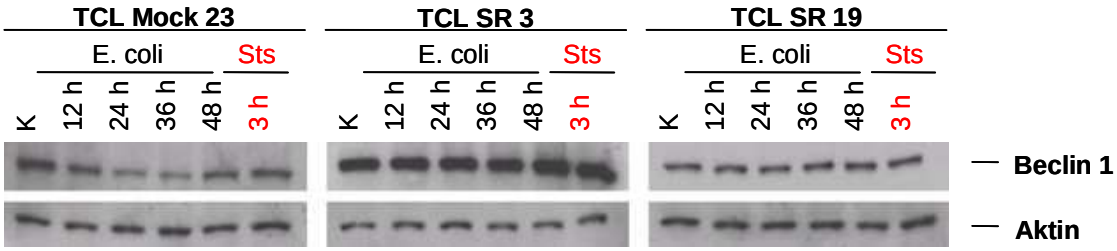


Abb. 20 *Western Blot-Analyse des Gesamtzelllysats (TCL) mit Antikörper gegen Beclin 1 nach Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) Top10 für eine Stunde und Stimulation mit Staurosporin für 3 h (Sts, rot gekennzeichnet). Aktin = Ladungskontrolle. SR: SR-Makrophagen (mit dem Superrepressor IκBα (inhibitorisches kappa B alpha) transfizierte Makrophagen), Mock: Mock-Makrophagen (mit einem Leervektor transfizierte Makrophagen), K: Kontrollprobe unstimulierter Zellen.*

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Makrophagen regulieren unter anderem das Zusammenspiel von angeborener und adaptierter Immunantwort. Sie bilden zusammen mit neutrophilen Granulozyten die erste Abwehr gegen das Eindringen von bakteriellen, viralen und fungiziden Pathogenen. Bei Entzündungsprozessen leiten Makrophagen inflammatorische Prozesse ein. Nach Prozessierung und Inkorporation von Antigenen und anschließender MHC-abhängiger Präsentation dieser Antigene werden B- und T-Lymphozyten und damit die adaptive Immunantwort initiiert.

Viele Mechanismen und Signalwege wirken zusammen, um die inflammatorische Antwort aufrechtzuerhalten bzw. zum richtigen Zeitpunkt wieder zu beenden. Dabei kommt der Balance zwischen Aufrechterhaltung und Terminierung des Entzündungsprozesses eine besondere Bedeutung zu. Störungen dieses eingestellten Wechselspiels führen zu schweren Krankheitsbildern, wie denen des septischen Schocks oder des Multiorganversagens. Hierbei wird als Erklärungsmodell auch eine verstärkte Transkription pro-inflammatorischer Gene nach Aktivierung zellulärer Stress-Signalwege herangezogen.

Besondere Bedeutung im Rahmen der Inflammation kommt dem Transkriptionsfaktor NF-κB zu. NF-κB moduliert im Allgemeinen sowohl die immunologische und inflammatorische Aktivität von Zellen als auch beispielsweise über die Produktion Apoptose-relevanter Proteine den Zelltod. Die Aktivierung von NF-κB läuft meist biphasisch ab [34]. Dabei schließt sich einer transienten, während der ersten Stunde nach Stimulation auftretenden und von der Degradation des IκBαs abhängigen ersten Phase der NFκB-Aktivierung eine zweite, länger persistierende Phase (ca. 12 h nach der Stimulation) an. Die genaue Bedeutung dieser biphasischen Aktivierung ist jedoch bisher nur wenig verstanden. Sie stellt einen wichtigen Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit dar, die den Einfluss der prolongierten Phase der Aktivierung von NF-κB auf den Phagozytose-induzierten Zelltod von Makrophagen untersucht. Zusammenhänge der zweiten Aktivierungsphase von NF-κB mit der Beendigung einer Inflammation sind denkbar. So haben Lawrence et al. im Pleuritismodell gezeigt, dass eine

späte Inhibition von NF-κB zu einer verminderten Apoptose von Leukozyten und einer verringerten TGFβ-Ausschüttung während der Resolution einer Inflammation führt [52].

Das In-vitro-System des IκBα-Superrepressors in Raw 264.7-Makrophagen wurde für diese Arbeit genutzt, um die Auswirkungen der zweiten Phase der NF-κB-Aktivierung auf den Phagozytose-induzierten Zelltod von Makrophagen zu untersuchen.

5.2 IκBα-Superrepressors in Raw 264.7-Makrophagen

5.2.1 Inhibition von NF-κB

Seit Jahren werden die genauen, mit NF-κB im Zusammenhang stehenden zellulären Mechanismen erforscht, um durch die Bereitstellung von Inhibitoren oder Modulatoren die Therapie von (Immun-) Erkrankungen beeinflussen zu können.

Mit Hilfe von Inhibitoren des NF-κBs, wie Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC), konnten interessante Erkenntnisse gewonnen werden. So beschreiben Pagliari et al. eine essenzielle Notwendigkeit der konstitutiven Aktivität von NF-κB für die Lebensfähigkeit von Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten im Gegensatz zu Fibroblasten, Epithelialzellen und Endothelzellen [74]. Ein Problem dieser Inhibitoren liegt jedoch in ihrer überwiegend unspezifischen Wirkungsweise. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese unspezifischen Inhibitoren nicht auch andere stressvermittelnde Signalwege blockieren. Für PDTC beispielsweise ist eine zusätzliche Inhibierung des JNK-Signalwegs bekannt [55]. Zusätzlich zu dem Nachteil der unspezifischen Wirkungsweise gibt es bisher keine Inhibitoren, die zu einer spezifischen Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB in den unterschiedlichen Phasen seiner Aktivierung führen. Aus diesem Grund scheinen für die Analyse einzelner Aktivierungsphasen des NF-κBs endogene Downregulations-Mechanismen, wie der hier und bereits in anderen Studien verwendete IκBα-Superrepressor, besser geeignet zu sein, um spezifische Effekte zu untersuchen.

5.2.2 Das System des IκBα-Superrepressors in Raw 264.7-Makrophagen

Durch die Expression des IκBα-Superrepressors in Raw 264.7-Makrophagen (SR-Zellen) wurde in einer vorangehenden Arbeit ein in-vitro-System etabliert, in dem die prolongierte NF-κB-Aktivierung unterdrückt wird [31].

In diesen SR-Makrophagen ist die frühe Phase der NF-κB-Aktivierung nahezu vollständig intakt. Endogenes IκBα und der IκBα-Superrepressor werden gleichzeitig exprimiert (vgl. 4.2.2, Abb. 5). Nach Stimulation mit E.coli und der damit verbundenen Aktivierung des NF-κB-Signalwegs wird in den SR-Zellen das vorliegende endogene IκBα im Gegensatz zum IκBα-Superrrepressor abgebaut. Dies führt zu einer zwar reduzierten, aber dennoch vorhandenen NF-κB-Bindungsaktivität im Kern, die in den SR-Zellen nach ca. 30 min nachlässt, während sie in den Mock-Zellen deutlich länger anhält [31]. Das System des IκBα-Superrepressors lässt somit eine frühe Aktivierung von NF-κB zu und inhibiert den NF-κB-Signalweg im Vergleich zu anderen Inhibitoren von NF-κB (z.B PDTC) nicht vollständig.

Im Vergleich zu den Mock-Zellen ist in den SR-Zellen jedoch die zweite Phase der NF-κB-Aktivität nicht mehr vorhanden. Die Gelshiftanalyse der nukleären NF-κB-Bindungsaktivität nach LPS-Stimulation und einstündiger E.coli-Phagozytose bestätigen dies. Die Mock 23-Zellen zeigen eine höhere Persistenz des aktiven p65/p50-NF-κB-Heterodimers im Kern. In den SR-Zellen nimmt die Aktivität des p65/p50-Heterodimers bereits nach ca. 30 min deutlich ab, während sie in den Mock-Zellen bis zu 16 h nach der Stimulation mit LPS erhalten bleibt (vgl. Abschnitt 4.1, Abb. 2). Ähnliche Ergebnisse werden auch nach Phagozytose von E.coli beobachtet (vgl. Ergebnisteil 4.1, Abb. 3). Gleichzeitig ist auch die Zunahme der transkriptionell inaktiven p50/p50-Homodimere in den Mock-Zellen nach Stimulation mit LPS erst nach ca. 8 h zu erkennen, während sich in den SR-Zellen eine Zunahme bereits nach 1 h bzw. 2 h zeigt.

Positive und negative Feedback-Mechanismen regulieren die Aktivität von NF-κB. So führt die Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalweges immer auch zu einer vermehrten Synthese des Inhibitors IκBα, der wiederum die NF-κB-Aktivierung beendet. Auch die Repression von DNA-Bindungsstellen durch p50-

bzw. p52-Homodimere stellt einen negativen Feedback-Mechanismus dar. Da p50 keine aktivierende Transkriptions-Domäne besitzt, blockieren p50-Homodimere bei Bindung an die DNA mögliche Bindungsstellen für transkriptionell aktives NF-κB (p65/p50-Heterodimere), während andere Rel-Proteine von IκBs inaktiviert und zurück ins Zytoplasma gebracht werden [9,104].

Die Restaktivität von NF-κB in den SR-Zellen gibt diesen gegenüber Makrophagen, denen NF-κB vollständig fehlt, einen deutlichen Überlebensvorteil. So ist bekannt, dass eine vollständige Inhibiton von NF-κB zu einer Caspase 3-unabhängigen Apoptose aufgrund einer mitochondrialen Dysfunktion und einer reduzierten Expression des anti-apoptotischen und durch NF-κB regulierten Proteins A1 führen würde [74,105].

5.2.3 Einfluss des IκBα-Superrepressor-Systems auf andere Signaltransduktionswege und Mitglieder des NF-κB-Signalwegs

Unspezifische Inhibitorsysteme von NF-κB, wie PDTC, beeinflussen häufig auch andere Signaltransduktionswege [55]. Der für diese Arbeit verwendete IκBα-Superrepressor hingegen zeigt keinen Einfluss auf andere Signalwege. Nach einstündiger Phagozytose von E.coli konnte beim Vergleich der JNK1- und JNK2-Expression in Mock- und SR-Zellen kein Unterschied festgestellt werden. Auch wird c-Jun in Mock- und SR-Zellen gleich stark phosphoryliert (vgl. Abschnitt 4.2.2, Abb. 7). Eine Beeinflussung anderer Stress-Signalwege, wie z.B. des JNK-Signalwegs, aufgrund der Suppression der zweiten Aktivierungsphase von NF-κB ist in diesem System somit unwahrscheinlich.

Auch hat die Suppression der zweiten Phase der NF-κB-Aktivierung nach Phagozytose von E.coli keinen Einfluss auf die Expression wichtiger Komponenten des NF-κB-Signalwegs. Die Expression von IKKα bleibt ebenso wie die Expression von IKKβ konstant (vgl Abschnitt 4.2.2, Abb. 6).

Wie zu erwarten, konnte nach Stimulation mit E.coli eine Zunahme von p52 im Kern beobachtet werden (vgl. Abschnitt 4.2.1, Abb. 4). Ein Unterschied zwischen Mock- und SR-Zellen war dabei allerdings nicht feststellbar.

Der in dieser Arbeit verwendete IκBα-Superrepressor stellt somit ein gutes Modell dar, um zelluläre und molekulare Unterschiede zu untersuchen, die von der prolongierten Aktivierungsphase von NF-κB abhängen.

5.3 E.coli induzierter Zelltod

5.3.1 Auswirkungen der NF-κB-Supression auf den Phagozytose-induzierten Zelltod von Raw 264.7-Makrophagen nach Phagozytose von E.coli

Die Phagozytose ist ein wesentlicher Mechanismus des angeborenen Immunsystems zur Eliminierung von Pathogenen. Es ist bekannt, dass die Phagozytose von Pathogenen zur Induktion eines programmierten Zelltods führen kann [24]. Zudem haben Häcker et al. gezeigt, dass auch die Phagozytose von E.coli durch Raw 264.7-Makrophagen zum Zelltod führt [33].

Interessanterweise konnte nach Phagozytose von E.coli ein deutlicher Unterschied in der Überlebensfähigkeit von normalen Raw 264.7-Makrophagen und NF-κB-supprimierten Raw 264.7-Makrophagen beobachtet werden. So zeigen Mock-Zellen im Vergleich zu SR-Zellen nach einstündiger Kokultur mit E.coli eine andere Zelltodkinetik (vgl. Abschnitt 4.3). Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zeigt, dass die SR-Zellen nach einstündiger Phagozytose von E.coli zu den frühen Zeitpunkten (nach 12 h und 24 h) im Vergleich mit den Mock-Zellen in signifikant größerer Zahl sterben. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine anti-apoptotische Funktion von NF-κB in der Frühphase nach der Phagozytose von E.coli durch Suppression der zweiten Aktivierungsphase von NF-κB supprimiert ist.

Obwohl die Induktion des Zelltods in SR-Makrophagen deutlich stärker und schneller ablief, konnte nach ca. 36 h ein gleich starkes Sterben zwischen Mock- und SR-Zellen beobachtet werden. Während sich die SR-Zellen zu den späten Zeitpunkten zu erholen scheinen, steigen die Zelltodraten der Mock-Zellen zum Zeitpunkt 48 h weiter an.

Dieses Ergebnis stärkt die Vermutung, dass der prolongierten Phase der NF-κB-Aktivierung Bedeutung für die Beendigung einer Inflammation zukommt. Dies stimmt auch mit Beobachtungen von Lawrence et al. überein, wonach eine

Inhibition von NF-κB zu einer verminderten Apoptose von Leukozyten und einer verringerten TGFβ-Ausschüttung führt [52]. Ein NF-κB abhängiger Zelltod spielt also auch bei der Auflösung einer infektiös bedingten Inflammation eine Rolle.

5.3.2 Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen Mechanismen des beobachteten Zelltods

Die Stimulation mit LPS führt zu einer Aktivierung des IKK/NF-κB-Signalwegs und hat eine Expression von TNFα [19,83] und IL1 [23,36] zur Folge. TNFα und IL1 wiederum stellen Induktoren des Zelltods dar. Um zu zeigen, dass die beobachteten Unterschiede im Zelltod von Mock- und SR-Makrophagen nicht durch exogene Stimulantien hervorgerufen werden, wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zum Zelltod von Mock- und SR-Makrophagen mit 24 h lang konditioniertem Medium durchgeführt. Als exogene Stimulantien kommen beispielsweise von den Zellen produzierte und ins Zellmedium ausgeschüttete Mediatoren in Frage.

Die Inkubation von Mock 23- und SR-Makrophagen mit konditioniertem Medium aus Mock- und SR-Zellen, die E.coli phagozytiert haben, ergibt nach Zeitintervallen bis zu 36 h keine wesentliche Zunahme der Zelltodrate in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse. Dabei ist zu betonen, dass weder eine deutliche Zunahme des frühen Zelltods in Mock-Zellen mit konditioniertem Medium von SR-Makrophagen noch eine deutliche Zunahme des späten Zelltods in SR-Makrophagen mit 24 h lang konditioniertem Medium von Mock 23-Zellen ausgelöst werden konnte (vgl. Abschnitt 4.4). Es kann daher angenommen werden, dass die zum Phagozytose-induzierten Zelltod von Makrophagen gemachten Beobachtungen überwiegend auf endogenen, zell-immanenten Mechanismen beruhen. Das beobachtete Zellsterben scheint damit in den Bereich des programmierten Zelltods einzuordnen zu sein.

5.3.3 Nekrose und Apoptose

Die Zuordnung des Erscheinungsbildes des PICDs von Mock- und SR-Zellen zu einer bestimmten Form des programmierten Zelltods erweist sich als schwierig. Häcker et al. beschreiben im Gegensatz dazu, dass Raw 264.7-Makrophagen 16 bis 24 h nach Phagozytose von E.coli mit dem Auftreten typischer

Apoptosezeichen in einen Zelltod übergehen [33]. Im vorliegenden Modell fehlen aber typische Zeichen der Apoptose (vgl. Abschnitt 4.5, Abb. 12). Zellschrumpfung, Kernkondensation und Kernfragmentation sowie eine Fragmentierung der DNA konnten in der vorliegenden Arbeit nach einstündiger Kokultur der Mock- und SR-Makrophagen mit E.coli-Bakterien nicht gefunden werden (vgl. Abschnitt 4.6.1). Zwar gibt es auch Formen des apoptotischen Zelltods, die nicht mit allen beschriebenen Apoptose-typischen Merkmalen einhergehen, Mock- und SR-Zellen zeigen aber nach Phagozytose von E.coli nur wenige Zeichen, die auf den Ablauf einer klassischen Apoptose hinweisen könnten.

In den letzten Jahren hat sich die Diskussion über andere, Apoptose-untypische Formen des programmierten Zelltods verstärkt. So ist besonders der programmierte Zelltod Typ II (= Autophagozytose) in das Gesichtsfeld vieler Wissenschaftler gerückt. Aber auch der Nekrose als Form des programmierten Zelltods („programmierte“ Nekrose) kommt mehr und mehr Bedeutung zu [106]. Die Abgrenzung dieser einzelnen Formen des programmierten Zelltods erscheint oft schwierig. Inzwischen ist bekannt, dass einige typische, mit der Apoptose assoziierte Proteine, wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, auch Formen des nekrotischen Zelltods modulieren können [44]. Die forcierte Bindung von Fas-assoziiertem Protein an Death Domains (FADD) induziert in Jurkat-derived Zelllinien (JB-6), die keine Caspase 8 exprimieren können, einen Caspase-unabhängigen Zelltod. Kawahara et al. konnten dabei weder eine Fragmentierung der DNA noch eine Zell- oder Zellkern-Fragmentierung oder eine Kondensation der Zelle nachweisen. Es wurde im Gegenteil eine Schwellung der Zelle und der Kerne beobachtet, die an eine Nekrose erinnerte [46]. Auch ist es nicht ungewöhnlich, dass Caspase-Aktivierungen, die als typisches Zeichen der Apoptose gewertet werden, mit Zeichen des nekrotischen Zelltods einhergehen. So wurde gezeigt, dass die Transfektion von L929-Fibrosarkomzellen mit einem CD95-Rezeptor die Aktivierung von Caspase 3 und -7 bewirkt. Der so ausgelöste Zelltod, der mikroskopisch Merkmale der Nekrose und nicht der Apoptose aufwies, konnte jedoch nicht durch spezifische Inhibitoren für Caspase 1 und Caspase 3 blockiert werden. Ein Einfluss der Caspaseaktivität auf den Ablauf der Nekrose ist in diesem Zusammenhang also auszuschließen [94]. Somit liegt nahe, dass im

Rahmen des Zelltodes apoptotische als auch Nekrose-assoziierte Signalwege induziert werden. Die endgültige Form des Zelltodes wird durch den überwiegenden Signalweg determiniert.

Leider ist eine einfache experimentelle Unterscheidung der Nekrose von anderen Formen des programmierten Zelltodes nicht möglich. Die mikroskopische Erscheinungsform der Mock- und SR-Zellen ist besonders durch ein massives Anschwellen der Zelle sowie der Ausbildung von Vakuolen geprägt. Auch wenn keine experimentellen Hinweise auf eine Nekrose als mögliche Form des Phagozytose-induzierten Zelltods vorliegen, kann man aufgrund der phänotypischen Erscheinungsform diese Form des Zelltodes nicht vollständig ausschließen.

Das Vorliegen einer klassischen Apoptose hingegen kann beim beobachteten Zelltod in der späten Phase nach E.coli Phagozytose weitestgehend ausgeschlossen werden. Das phänotypische Erscheinungsbild der Mock- und SR-Zellen zeigt weder eine Zellschrumpfung noch eine Kernschrumpfung. Die Auftrennung genomischer DNA aus Mock- und SR-Zellen nach Phagozytose von E.coli zeigt keine Fragmentierung der DNA. Die Fragmentierung der DNA allerdings ist ein charakteristisches Merkmal der Apoptose. Lediglich einige für die Apoptose typische Membranblebs erscheinen in den Mock-Zellen nach 36 h-48 h und in den SR-Zellen nach 12 h bis 24 h.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen für Mock-Zellen zwar eine Aktivierung der Apoptose-typischen Proteins Caspase 3 (vgl. Abschnitt 4.6.2.1), hingegen aber keine wesentliche Modulationen von Apoptose-assoziierten Proteinen (vgl. Abschnitt 4.6.2.2). Lediglich mit Hilfe des RNA-Protection-Assays lässt sich in allen drei Zellklonen eine geringe Zunahme von Bcl-$x_{L/S}$- und Bfl1-mRNA nach Stimulationsbeginn gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe beobachten.

Auch Western Blots des Gesamtzellextrakts von Mock- und SR-Makrophagen mit Antikörpern gegen das pro-apoptotische Protein Bax und das anti-apoptotische Protein cIAP2 zeigen im beobachteten Zeitverlauf keine bedeutenden Veränderungen der Expression dieser Proteine (vgl. Ergebnisteil 4.6.2.2). Der beobachtete Phagozytose-induzierte Zelltod wird von NF-κB demnach nicht durch die Abnahme des anti-apoptotischen Proteins cIAP2 oder

durch die Zunahme des pro-apoptotischen Proteins Bax vermittelt. Da dieses Ergebnis sowohl in den Mock- als auch in den SR-Makrophagen zu beobachten ist, scheint die Suppression der prolongierten Aktivitätsphase von NF-κB nicht über die Regulation dieser beiden Proteine die beobachteten Unterschiede des Phagozytose-induzierten Zelltods hervorzurufen. Auch die Expression von CD95-Ligand bleibt sowohl in den Mock-Makrophagen als auch in den SR-Makrophagen während des beobachteten Zeitverlaufs konstant.

Es ist bekannt, dass eine wichtige Aufgabe des NF-κBs in Makrophagen darin besteht, die durch LPS induzierte Apoptose zu verhindern [40]. Das Bakterium Yersinia pestis nutzt diesen Mechanismus, um der Erkennung durch das adaptive Immunsystem zu entgehen. Durch Injektion des Proteins YopJ in Makrophagen verhindert Yersinia Pestis die Aktivierung von IKK und induziert somit eine Apoptose der Makrophagen [73]. Die Induktion von Apoptose ist, wie bereits oben erwähnt, für die SR-Zellen mit supprimierter prolongierter NF-κB-Aktivität aber weder mikroskopisch noch durch DNA-Fragmentierung eindeutig nachweisbar. Interessanterweise ergaben die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse und die Färbung mit Trypanblaulösung im Vergleich zur Färbung nach Nicoletti, die spezifisch apoptotische Zellen markiert [67], deutlich höhere Zelltodraten sowohl für Mock 23- als auch für SR-Makrophagen (vgl. Abschnitt 4.3 und 4.6.1.2). Im vorliegenden Modell scheint also neben der klassischen Apoptose ein weiterer Mechanismus für den Phagozytose-induzierten Zelltod vorzuliegen, der mit unspezifischeren Methoden, wie der Trypanblaufärbung und der Zellzyklusanalyse, ermittelt werden kann.

5.3.4 Autophagozytose

Eine weitere Form des programmierten Zelltods ist die Autophagozytose (programmierter Zelltod Typ II). Autophagozytose kann als eine Art Selbstverdauung der Zelle mit Ausbildung von Autophagolysosomen bezeichnet werden. Der Autophagozytose kommt sowohl eine physiologische Bedeutung (Abbau von Organellen, zelluläre Differenzierung) als auch eine Beteiligung an zahlreichen pathologischen Prozessen (Tumore, neurodegenerative Prozesse wie Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington) zu [3,49,69,98]. Phänotypisch ist die Autophagozytose durch die Ausbildung charakteristischer, teilweise sehr

großer Vakuolen gekennzeichnet. Mock- und SR-Zellen weisen nach Phagozytose von E.coli morphologische Merkmale der Autophagozytose auf. So ist in den Mock-Zellen bereits nach 12 h eine deutliche Vakuolisierung erkennbar und auch die SR-Zellen bilden nach 24 h Phagozytose von E.coli deutliche Vakuolen aus. Es ist bekannt, dass der Autophagozytoseprozess von typischen Apoptosemerkmalen begleitet werden kann [18]. Damit ist das bereits erwähnte Auftreten der Membranblebs in Mock- und SR-Zellen erklärbar.

Biederbick et al. zeigten erstmals, dass autophagozytotischen Vakuolen bzw. Autophagosomen mit Monodansylcadaverin (MDC) anzufärben sind [8,42].

Es fällt auf, dass die Färbung mit MDC Unterschiede für Mock- und SR-Makrophagen zeigt (vgl. Abschnitt 4.6.3.1). Während die Mock-Zellen keine erkennbaren Ansammlungen von MDC in den Vakuolen aufweisen, sind die Ansammlungen von MDC in den Vakuolen der SR-Zellen (beispielhaft gezeigt an SR-Klon 19) deutlich erkennbar. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die NF-κB-inhibierten Zellen autophagozytotische Vakuolen bilden können, während dies in den Mock-Zellen nicht möglich ist. Nach Vorinkubation der Zellen mit 3-MA, einem spezifischen Hemmstoff der Autophagozytose [80], ist die Anfärbung mit MDC negativ und bestätigt damit die Vermutung, dass es sich bei den Vakuolen in den SR-Zellen um autophagozytotische Vakuolen handelt. Die oben beschriebenen MDC-gefärbten Vakuolen nämlich konnten in den SR-Zellen nach Vorinkubation mit 3-MA und anschließender Stimulation mit E.coli nicht mehr beobachtet werden.

Mit Hilfe der RT-PCR sowie des Western Blots konnte eine Abnahme der Aktivität von Atg5 und Beclin 1 in den Mock-Zellen beobachtet werden (vgl. Ergebnisteil 4.6.3.2). Beide Gene sind für den Ablauf der Autophagozytose unabdingbar. Atg5 im Komplex mit Atg12 ist für die Assoziierung von LC3 an die Isolations-Membran während der Bildung der Autophagosomen nötig. Dies wird dadurch bestätigt, dass in Atg5 Knockout-Zellen keine Bindung von LC3 an die Isolationsmembran nachweisbar ist [65]. Die Abnahme von Atg5 und Beclin 1 in den Mock-Makrophagen war vor allem zu den frühen Zeitpunkten (12 h und 24 h) nach Kokultur mit E.coli zu sehen. In den SR-Zellen konnte hingegen mit Hilfe der RT-PCR weder eine Abnahme von Atg5 noch von Beclin 1 beobachtet werden. Auch der Western Blot mit einem Antikörper gegen Beclin 1 zeigt, dass in den SR-

Zellen die Expression von Beclin 1 konstant bleibt, während sie in den Mock-Zellen zu den Zeitpunkten 12 h und 24 h deutlich abnimmt (vgl. Ergebnisteil 4.6.3.3). Dies weist darauf hin, dass die prolongierte NF-κB-Aktivierungsphase über die Regulation autophagozytotischer Gene wie Atg5 und Beclin 1 den Ablauf der Autophagozytose beeinflusst. In den Mock-Zellen, in denen NF-κB normal aktiviert wird, erfolgt eine Repression der autophagozytotischen Gene Beclin 1 und Atg5 nach Phagozytose von E.coli, hierdurch wird der Ablauf einer Autophagozytose verhindert. Das Fehlen der zweiten NF-κB-Aktivierungsphase hat in den SR-Zellen zur Folge, dass Beclin 1 und Atg5 auch nach Phagozytose von E.coli konstant exprimiert werden und somit die Autophagozytose ermöglicht wird. Es ist bekannt, dass SR-Makrophagen vermehrt ROS produzieren [31], die Suppression der prolongierten Phase der NF-κB-Aktivierung somit mit einer vermehrten ROS-Produktion einhergeht. Xu et. al. haben gezeigt, dass ROS für die Auslösung der Autophagozytose wichtig sind [97]. Es ist denkbar, dass die konstant bleibende Expression von Atg5 und Beclin 1 auf mRNA- und Proteinebene in SR-Makrophagen über die verstärkte Produktion von ROS reguliert wird und einen wesentlichen auslösenden Faktor bei der Induktion Autophagozytose-spezifischer Signalwege darstellt (vgl. Ergebnisteil 4.6.3.2 und 4.6.3.3).

5.3.5 Zusammenhang von Apoptose und Autophagozytose

Der Zusammenhang von Apoptose und Autophagozytose ist bisher nicht vollständig geklärt. Sowohl die eindeutige Trennung von Apoptose und Autophagozytose als auch die enge Verknüpfung beider Zelltodmechanismen werden intensiv diskutiert. Es wurde gezeigt, dass einerseits die Inhibition der Apoptose durch Wachstumsfaktorentzug zum Erscheinungsbild eines chronischen degenerativen autophagozytotischen Zelltods führt [18], andererseits jedoch sowohl die pharmakologische (z.B. durch 3-MA) als auch genetische (interferierende RNA gegen Atg5, Beclin 1, Atg10 und Atg12) Hemmung der Makroautophagozytose in HELA-Zellen einen apoptotischen Zelltod induziert [11]. Ein Hin- und Herschalten zwischen apoptotischen und autophagozytotischen Zelltodmechanismen ist zum Beispiel für neurodegenerative Erkrankungen sowie

einige andere Zellarten (z.B. Keratinozyten) nachgewiesen worden [13]. Wodurch dieses Umschalten bewirkt wird, ist unklar.

Ob die Autophagozytose einen Mechanismus darstellt, der direkt zum Zelltod führt oder ein Sekundäreffekt der Apoptose ist, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Die genaue Trennung von Apoptose und Autophagozytose fällt auch für die an den Mock- und SR-Zellen gemachten Beobachtungen schwer. Wenige Merkmale deuten auf eine Apoptose hin, während andere Beobachtungen diese eher ausschließen und auf Autophagozytose hinweisen. Die im Western Blot für Mock 23-Makrophagen gesehene Apoptose-typische Aktivierung der Caspase 3 nach E.coli-Phagozytose ist im Vergleich zu der durch das Zytostatikum Staurosporin ausgelösten gering (vgl. Abschnitt 4.6.2.1). Im Zusammenhang mit den phänotypischen Merkmalen und den Ergebnisse aus der MDC-Färbung kann diese mäßige Aktivierung der Caspase 3 unterschiedlich interpretiert werden. Es ist bekannt, dass Caspaseaktivität durch proteolytische Spaltung regulierender Faktoren die Autophagozytose inhibiert [15] und die Hemmung von Caspase 8 einen autophagozytotischen Zelltod bewirken kann [100]. Insbesondere zu späten Zeitpunkten nach NF-κB-Aktivierung sind pro-apoptotische Funktionen dieses Signalweges beschrieben [52]. So ist denkbar, dass die Supression der NF-κB-Aktivität primär eine Aktivierung von Caspasen verhindert und somit der Ablauf von Autophagozytose gefördert wird. Andererseits wird aber auch die Meinung vertreten, dass Nährstoffentzug und Autophagozytose-Hemmung in vitro zu einer Aktivierung von Caspase 3 führen und somit einen apoptotischen Zelltod fördern [11]. Die NF-κB-gesteuerte Unterdrückung der Autophagozytose geht parallel mit einer Aktivierung der Caspase 3 in den Mock 23-Makrophagen einher und ist auf eine verminderte Expression von Beclin 1 und Atg5 zurückzuführen.

Embryonale Bax/Bak$^{-/-}$-Fibroblasten, die resistent gegen die Auslösung einer Apoptose sind, unterliegen nach Stimulation mit Etoposide oder Staurosporin einem programmierten Zelltod Typ II. Hierfür wird die Dysbalance zwischen den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2/Bcl-x_L und den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak verantwortlich gemacht. Dabei könnten Bcl-2/Bcl-x_L die Bildung von Autophagosomen über Beclin 1 steuern, das eine Bindung mit Bcl-2/Bcl-x_L

eingehen kann [57] und für den autophagozytotischen Zelltod von $Bax^{-/-}$/$Bak^{-/-}$ Fibroblasten benötigt wird [85].

Es ist bekannt, dass dieser Mechanismus in-vitro nicht in allen Zelltypen auslösbar ist (so etwa nicht in Hela-Zellen und Jurkat-Zellen) [85]. Ein Einfluss der NF-κB-regulierten Bcl-2-Proteine auf den Ablauf der in den SR-Makrophagen beobachteten Autophagozytose kann nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des RNA-Protection-Assays zeigen jedoch, dass zumindest Bcl-x_L in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt.

Die genauen Mechanismen, mit denen die zweite NF-κB-Aktivierungsphase die Autophagozytose hemmt, müssen noch genauer untersucht werden. Da weder Beclin 1 noch Atg5 Promotorstellen für NF-κB aufweisen, liegt eine indirekte Wirkungsweise von NF-κB nahe [78].

Zusammengefasst sind Apoptose und Autophagozytose demnach parallel ablaufende Mechanismen, deren Ergebnis vom quantitativen Verhältnis zueinander abhängt.

5.4 Biologische Bedeutung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Zelltod mit Hilfe der Zellzyklusanalyse haben gezeigt, dass sich die SR-Makrophagen im Vergleich zu den Mock-Makrophagen 36 h nach einstündiger Phagozytose von E.coli zu erholen scheinen. Gleichzeitig konnte durch die Färbung der Vakuolen mit MDC gezeigt werden, dass die SR-Zellen autophagozytotische Vakuolen bilden, während die Vakuolen der Mock-Zellen nicht mit MDC angefärbt werden konnten und somit auch nicht typisch autophagozytotisch sind. Die beobachtete Erholung der SR-Makrophagen ist somit durch den Mechanismus der Autophagozytose bedingt. Die prolongierte NF-κB-Aktivierungsphase scheint also den Ablauf einer Autophagozytose bei den Mock-Zellen zu verhindern, während aufgrund der Inhibierung des NF-κBs bei den SR-Zellen die Autophagozytose auftreten oder zumindest stärker wirken kann und somit als Rettungsmechanismus vor einem endgültigen Zelltod nutzbar ist.

Autophagozytose als Mechanismus zur Rettung der Zelle ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden. So ist sie notwendig, um Neugeborene während der Neonatalperiode ausreichend mit Aminosäuren zu versorgen und

somit die Lebensfähigkeit zu erhalten [49]. Der Anstieg der Autophagozytose während dieser Zeit wird dabei besonders in den Geweben beobachtet, die einer plötzlichen Steigerung des Energiebedarfs unterliegen (z.B. im Herz und im Zwerchfell) oder besondere Anforderungen aufgrund der Anpassung an die nach der Geburt veränderten Umgebungsbedingungen erfüllen müssen. Dies gilt besonders für die Haut und für die Lungenalveolen. Auch ist die Autophagozytose in Säugetieren ein essenzieller Mechanismus, um bei Fehlen von Wachstumsfaktoren, die für die Aufnahme von extrazellulären Nahrungsstoffen in die Zelle unabdingbar sind, die Homöostase der Zelle zu gewährleisten [61].

Der Autophagozytose als Rettungsmechanismus kommt auch darin Bedeutung zu, dass stark geschädigte Zellen, deren Mitochondrien noch intakt sind, durch Autophagozytose vor dem Zelltod gerettet werden können. Sobald jedoch das Mitochondrienpotential unter einen kritischen Wert abgefallen ist, kommt es zum programmierten Zelltod Typ II [11,75,76]. Ein weiteres Argument für die Rolle der Autophagozytose als Rettungsmechanismus ist, dass die Hemmung der Makroautophagozytose durch eine Triggerung die Apoptose begünstigt [11].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die vorangehend aufgeführten Argumente aus Arbeiten anderer Gruppen sprechen dafür, dass NF-κB insofern an der Resolution einer Inflammation beteiligt ist, indem es den Ablauf einer Autophagozytose hemmt bzw. proapoptotische Mechanismen induziert. Die Autophagozytose könnte zur Rettung der Zelle vor einem endgültigen Zelltod beitragen. Für die Resolution einer Inflammation aber ist es wichtig, inflammatorische Zellen zu beseitigen. Findet eine regelrechte Terminierung der Inflammation nicht statt, so resultiert eine chronische Entzündung, die deletär enden kann, wie man an der Abfolge Sepsis, septischer Schock bis hin zum Multiorganversagen sehen kann.

6 Zusammenfassung

Makrophagen sind wesentlicher Bestandteil einer Immunantwort. Einerseits fördern und modulieren sie den Ablauf einer Inflammation, andererseits sind sie aber auch, beispielsweise durch Eliminierung apoptotischer inflammatorischer Zellen, an der Beendigung einer Inflammation beteiligt. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor für den Ablauf und die Regulation einer Inflammation ist der nukleäre Faktor kappa B (NF-κB).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der prolongierten Aktivierungsphase von NF-κB hinsichtlich des Zelltods von Raw 264.7-Makrophagen nach der Phagozytose von Escherichia coli (E.coli) untersucht. Hierzu wurden Raw 264.7-Markophagen mit einem IκBα (inhibitorischer kappa B alpha)-Superrepressor transfiziert. Diese Zellen werden als SR (Superrepressor)-Zellen bezeichnet, mit einem Leervektor transfizierte Kontrollzellen werden Mock-Zellen genannt. Es konnte gezeigt werden, dass in den SR-Makrophagen eine frühe Phase der NF-κB-Aktivierung nahezu vollständig intakt ist. Mit Hilfe von Gelshiftanalysen der nukleären NF-κB-Bindungsaktivität nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation und einstündiger E.coli-Phagozytose konnte bestätigt werden, dass in den SR-Zellen im Gegensatz zu den Mock-Zellen die zweite prolongierte NF-κB-Aktivierungsphase nicht mehr vorhanden ist. Im Vergleich zu anderen Inhibitoren von NF-κB lässt das System des IκBα-Superrepressors eine frühe Aktivierung von NF-κB zu und inhibiert den NF-κB-Signalweg nicht vollständig.

Des Weiteren wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen bewiesen, dass die Inhibition der prolongierten NF-κB-Aktivierungsphase durch den IκBα-Superrepressor keinen Einfluss auf andere Stresssignalwege, wie beispielsweise den JNK (c-Jun-NH_2-terminale Kinase)-Signalweg, hat und somit spezifisch ist.
Bei der Beobachtung des phänotypischen Erscheinungsbildes von Mock- und SR-Zellen nach Phagozytose von E.coli wurden deutliche Unterschiede festgestellt. So bilden SR-Zellen viele kleine Vakuolen aus, während die Vakuolen der Mock-Zellen hingegen größer und in der Zahl geringer erscheinen. Unterschiede konnten auch in der Kinetik des Zelltods nach Phagozytose von E.coli beobachtet werden. Während für die SR-Zellen in den ersten 24 Stunden nach der Phagozytose von E.coli, verglichen mit den Mock-Zellen, deutlich höhere

Zelltodraten beobachtet wurden, haben sich die SR-Zellen nach 36 bis 48 Stunden erholt. Die Mock-Zellen hingegen scheinen auch nach 48 Stunden noch nicht mit einer Regeneration begonnen zu haben und zeigen weiterhin hohe Zelltodraten.

Mit Hilfe von Stimulationsreihen mit konditioniertem Medium konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die beobachteten Unterschiede nicht primär auf extrazellulär induzierten Mechansimen beruhen, sondern endogen bedingt sind.
Um die Unterschiede auf molekularer Ebene zu begründen, wurden Untersuchungen zur Art des vorliegenden Zelltods gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten der apoptotischen Form des Zelltods in diesem Phagozytose-induziertem Zelltod (PICD)-System unwahrscheinlich ist, da das phänotypische Aussehen weder für die Mock- noch für die SR-Zellen bis auf wenige Membranblebs Apoptose-typische Merkmale erkennen ließ. Auch die für die Apoptose typische DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Fragmentierung sowie die Aktivierung Apoptose-relevanter Proteine konnte für Mock- und SR-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Die Färbung von autophagozytotischen Vakuolen mit Monodansylcadaverin ergab Hinweise darauf, dass in den SR-Zellen nach Phagozytose von E.coli Autophagozytose induziert wird, während das für die Mock-Zellen nicht der Fall ist. Unterstützt wurden diese Beobachtungen auch dadurch, dass 3-Methyladenin, ein spezifischer Hemmstoff der Autophagozytose, die Bildung der typischen Autophagosomen in den SR-Zellen hemmt. Polymerasekettenreaktion und Western Blot zeigen, dass es in den Mock-Zellen zu einer Abnahme von Beclin 1 und Atg5 („Autophagy related“) kommt, während diese in den SR-Zellen konstant exprimiert werden. Beide Proteine sind an der Autophagozytose kausal beteiligt.

Die prolongierte NF-κB-Aktivierungsphase in Raw 264.7-Makrophagen scheint nach Phagozytose von E.coli den Ablauf einer Autophagozytose indirekt durch Suppression der Autophagozytose-relevanten Proteine Beclin 1 und Atg5 zu verhindern. Es ist vorstellbar, dass über diesen Mechanismus eine zellrettende Autophagozytose verhindert wird und so terminal differenzierte aktivierte Makrophagen programmiert absterben können. Besonders im Zusammenhang mit der Resolution einer Entzündung ist die Elimination inflammatorischer Zellen unabdingbar. Damit würde der prolongierten NF-κB-Aktivierung eine entscheidende anti-inflammatorische Bedeutung zukommen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D, Vandenbunder B, Enrietto PJ: High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo in bone marrow cells in vitro. *Cell 75: 899-912* (1993)
2. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B: Cloning and genomic structure of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics 59: 59-65* (1999)
3. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y: Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol 12: 25-31* (1997)
4. Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y: Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol 124: 903-913* (1994)
5. Barnes PJ, und Karin M: Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med 336: 1066-1071* (1997)
6. Beg A, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature 376: 167-170* (2002)
7. Bentires-Alj M, Dejardin E, Viatour P, Van Lint C, Froesch B, Reed JC, Merville MP, Bours V: Inhibition of the NF-kappa B transcripition factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene 20: 2805-2813* (2001)
8. Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP: Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol 66: 3-14* (1995)
9. Bohuslav J, Kravchenko VV, Parry GCN, Erlich JH, Gerondakis S, Mackman N, Ulevitch RJ: Regulation of an essential innate immune

response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest 102: 1645-1652* (1998)

10. Bonizzi G, Karin M: The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol 25: 280-288* (2004)
11. Boya P, González-Polo R, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G: Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol 25: 1025-1040* (2005)
12. Brennan MA, Cookson BT: Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol 38: 31-40* (2000)
13. Bultzingslowen I, Jontell M, Hurst P, Nannmark U, Kardos T: 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol 37: 537-544* (2001)
14. Caamano J, Hunter CA: NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev 15: 414-429* (2002)
15. Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, Lenardo MJ: A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem 278: 51613-51621* (2003)
16. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem 162: 156-159* (1987)
17. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW: Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis cIAP2 is under NF-kappa B control. *Proc Natl Acad Sci USA 94: 10057-10062* (1997)
18. Clarke PGH: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol 181: 195-213* (1990)
19. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P: Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol 10: 1498-1506* (1990)

20. Degterev A, Boyce M, Yuan J: A decade of caspases. *Oncogene 22: 8543-8567* (2003)
21. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR: The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity 17: 525-35* (2002)
22. Deter RL, de Duve C: Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol 151: 519-528* (1967)
23. Dinarello CA, Wolff SM: The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med 328: 106-113* (1993)
24. Dockrell DH, Lee M, Lynch DH and Read RC: Immune-mediated phagocytosis and killing of Streptococcus pneumoniae are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis 184: 713-722* (2001)
25. Dunn WA: Studies on the mechanisms of autophagy; formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol 110: 1923-1933* (1990)
26. Dunn WA: Studies on the mechanisms of autophagy; maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol 110: 1935-1945* (1990)
27. George MD, Baba M, Scott SV, Mizushima N, Garrison BS, Ohsumi Y, Klionsky DJ: Apg5b functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Mol Biol Cell 11: 969-982* (2000)
28. Gosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol 16: 225-260* (1998)
29. Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, Li R, Cossart P: The RickA protein of Rickettsia conorii activates the Arp2/3 complex. *Nature 427: 457-461* (2004)
30. Grimm S, Baeuerle PA: The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J 290: 297-308* (1993)

31. Groesdonk HV, Schlottmann S, Richter F, Georgieff M, Senftleben U: Escheria coli prevents phagocytosis-induced death of macrophages via classical NF-kappa B signaling, a link to T-cell activation. *Infect Immun 74: 5989-6000* (2006)
32. Grossmann M, O'Reilly LA, Gugasyan R, Strasser A, Adams JM, Gerondakis S: The antiapoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J 19: 6351-6360* (2000)
33. Häcker H, Fürmann C, Wagner H, Häcker G: Caspase-9/-3 activation and apoptosis are induced in mouse macrophages upon ingestion and digestion of Escherichia coli bacteria. *J Immunol 169: 3172-3179* (2002)
34. Han SJ, Ko HM, Choi JH, Seo KH, Lee HS, Choi EK, Choi IW, Lee HK, Im SY: Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induces biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem 277: 44715-44721* (2002)
35. Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galán JE: A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol 163: 1123-1131* (2003)
36. Hiscott J, Marois J, Garoufalis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G: Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin-1 beta promotor: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol 13: 6231-6240* (1993)
37. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J: Tas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunol 1: 489-495* (2000)
38. Horwitz BH, Scott ML, Cherry SR, Bronson RT, Baltimore D: Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-κB-deficient fetal liver cells. *Immunity 6: 765-772* (1997)
39. Hoyos B, Ballard DW, Bohnlein E, Siekevitz M, Greene WC: Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science 244: 457-460* (1989)

40. Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M: The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature 428: 341-345* (2004)
41. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M: Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of Ikappa B kinase. *Science 284: 316-320* (1999)
42. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A: DAP Kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed celll death. *J Cell Biol 157: 455-468* (2002)
43. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J 19: 5720-5728* (2000)
44. Kane DJ, Ord T, Anton R, Bredesen DE: Expression of Bcl-2 inhibits necrotic neural cell death. *J Neurosci Res 40: 269-275* (1995)
45. Karin M, Ben Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- kappaB activity. *Annu Rev Immunol 18: 621-663* (2000)
46. Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumara H, Uchiyama Y, Nagata S: Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol 143: 1353-1360* (1998)
47. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer 26: 2103-2108* (1972)
48. Kirschnek S, Ying S, Fischer SF, Häcker H, Villunger A, Hochrein H, Häcker G: Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol 174: 671-679* (2005)
49. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakay H, Yoshomiro T, Oshumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature 432: 1032-1036* (2004)
50. Lai JH, Horvath G, Subleski J, Bruder J, Ghosh P, Tan TH: RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin-2 promotor. *Mol Cell Biol 15: 4260-4271* (1995)

51. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M: IKKα limits macrophage NF-κB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature 434: 1138-1143* (2005)
52. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA: Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat Med 7: 1291-1297* (2001)
53. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G: NF-kappa B-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B-lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA 96: 9136-9141* (1999)
54. Li Q, van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM: Severe liver degeneration in mice lacking the IκB kinase 2 gene. *Science 284: 321-325* (1999)
55. Li WG, Coppey L, Weiss RM, Oskarsson HJ: Antioxidant therapy attenuates JNK activation and apoptosis in the remote noninfarcted myocardium after large myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun 280: 353-357* (2001)
56. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B: Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature 402: 672-676* (1999)
57. Liang XH, Kleemann LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B: Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2 interacting protein. *J Virol 72: 8586-8596* (1998)
58. Libermann TA, Baltimore D: Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol 10: 2327-2334* (1990)
59. Liu SF, Malik AB: NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L622-L645* (2006)
60. Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrad WT, Wang X: The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA 95: 8461-8466* (1998)

61. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompsen CB: Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell 120: 237-248* (2005)
62. Matsuda N, Hattori Y, Takahashi Y, Nishihira J, Jesmin S, Kobayashi M, Gando S: Therapeutic effect of in vivo transfection of transcription factor decoy to NF-kappa B on septic lung in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 287: L1248-L1255* (2004)
63. Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD, Hawkins HK: Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am J Pathol 83: 485-498* (1976)
64. Mizushima N, Noda T, Yohsimori T, Tanaka Y, Ishii T, Gorge MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y: A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature 395: 395-398* (1998)
65. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T: Dissection of Autophagosome Formation using APG5-deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J Cell Biol 152: 657-667* (2001)
66. Mora AL, Corn RA, Stanic AK, Goenka S, Aronica M, Stanley S, Ballard DW, Joyce S, Boothby M: Antiapoptotic function of NF-kappa B in T-Lymphocytes is influenced by their differentiation status: role of Fas, c-Flip and Bcl-x_L. *Cell Death Differ 10: 1032-1044* (2003)
67. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, Grignani F, and Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods 139: 271-279* (1991)
68. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y: Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature 406: 906-910* (2000)
69. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM: Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol 64: 113-122* (2005)

70. Nonaka M, Huang ZM: Interleukin-1-mediated enhancement of mouse factor B gene expression via NF kappa B-like hepatoma nuclear factor. *Mol Cell Biol 10: 6283-6289* (1990)
71. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock 16: 83-96* (2001)
72. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C: Escape from intracellular Shigella from autophagy. *Science 307: 727-731* (2005)
73. Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE: Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science 290: 1594-1597* (2000)
74. Pagliari LJ, Perlman H, Liu H, Pope RM: Macrophages require constitutive NF-κB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol 20: 8855-8865* (2000)
75. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J: A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acicic vesicles. *Cancer Res 61: 439-444* (2001)
76. Rodriguez- Enriquez S, He L, Lemaster JJ: Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol 36: 2463-2472* (2004)
77. Savill J: Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol 61: 375-380* (1997)
78. Schlottmann S, Senftleben U.: (Publikation in Vorbereitung)
79. Seglen PO, Bohley P: Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanism. *Experientia 48: 158-172* (1992)
80. Seglen PO, Gordon PB: 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA 79: 1889-1892* (1982)
81. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun S.-C, Karin M: Activation by IKKα of a second, evolutionary conserved, NF-κB Signaling Pathway. *Science 293: 1495-1499* (2001)

82. Senftleben U, Li ZW, Baud V, Karin M: IKKbeta is essential for protecting T-cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity 14: 217-230* (2001)
83. Shakov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV: Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med 171: 35-47* (1990)
84. Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K: Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol Cell Biol 10: 561-568* (1990)
85. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson C, Tsujimoto Y: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature 6: 1221-1228* (2004)
86. Sica A, Dorma L, Viaggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA: Interaction of NF-kappa B and NFAT with the interferon-gamma promotor. *J Biol Chem 272: 30412-30420* (1997)
87. Sica A, Tan TH, Rice N, Kretzschmar M, Ghosh P, Young HA: The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci USA 89: 1740-1744* (1992)
88. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J: Nuclear factor (NF)-kappa B- regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cell from tumor necrosis factor alpha-induced apopotosis. *J Exp Med 188: 211-216* (1998)
89. Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N, Akira S: Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science 284: 313-316* (1999)
90. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PML, Blanz J, von Figura K, Saftig P: Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2 deficient mice. *Nature 406: 902-906* (2000)

91. Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E: Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell 10: 1367-1379* (1999)
92. Tilney LG, Portnoy DA: Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. *J Cell Biol 109: 1597-1608* (1989)
93. Tsukada M, Ohsumi Y: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett 333: 169-174* (1993)
94. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P: Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathway. *J Exp Med 188: 919-930* (1998)
95. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr.: NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science 281: 1680-1683* (1998)
96. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW: Essential contribution of caspase3/Cpp32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev 12: 806-819* (1998)
97. Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J: Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem 281: 19179-19187* (2006)
98. Yamamoto A, Cremona ML, Rothman JE: Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol 172: 719-731* (2006)
99. Yang X, Chang HY, Baltimore D: Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol Cell 1:319-325* (1998)
100. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ: Regulation of an ATG7-Beclin 1 program of autophagic cell death by Caspase 8. *Science 304: 1500* (2004)
101. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjerneberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA:

Macroautophagy- a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol 171: 15-17* (2005)

102. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, Flavell RA: Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA 95: 13618-13623* (1998)

103. Zhong H, May MJ, Jimi E, Gosh S: The phosphorylation status of nuclear NF-kappaB determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell 9: 625-636* (2002)

104. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bauerle PA, Haas JG, Riethmuller G: Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem 269: 17001- 17004* (1994)

105. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C: The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-κB that blocks TNFα-induced apoptosis. *Genes Dev 13: 382- 387* (1999)

106. Zong WX, Thompson CB: Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev 20: 1-15* (2006)

Danksagung

Herrn PD Dr. Uwe Senftleben danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Dr. Silke Schlottmann hat durch vielfältige Unterstützung und wertvolle Tipps zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Bei Bettina Stahl, Rosemarie Meyer und Sina Heydrich möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie die gute Atmosphäre im Labor bedanken.

Für die Hilfe bei der Zellfotografie möchte ich mich ganz herzlich bei Eberhard Reithmeier bedanken.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und bei Cornelius bedanken, die mich während der Studienzeit unterstützt und begleitet haben. Meinem Bruder Johannes danke ich ganz herzlich für seine Hilfe bei Computerproblemen.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Agnes Franziska Buback
Geburtsdatum/-ort	11. November 1980 in Karlsruhe
Wohnort	Alte Dorfstrasse 57E 37120 Bovenden-Eddigehausen
Nationalität	Deutsch
Schulbildung	
1987-1991	Grundschule Eddigehausen
1991-1993	Orientierungsstufe Lutherschule Göttingen
1993-2000	Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen
September 1997- März 1998	King's College Taunton, England
Juli 2000	Abitur
Akademische Ausbildung	
seit Oktober 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
September 2002	Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung
seit August 2004	Anfertigung der Dissertation zum Thema „Die Bedeutung des klassischen NF-κB-Signalwegs für den Phagozytose-induzierten Zelltod von Raw 264.7-Makrophagen“
April 2006- März 2007	Praktisches Jahr an der Universität Ulm, Memorial University Newfoundland und Tufts University Boston (gefördert durch ein DAAD-Stipendium)
Juni 2007	Abschluss der Ärztlichen Prüfung
seit Oktober 2007	Assistenzärztin in der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie Ulm