

**Bedeutung des intrinsischen apoptotischen
Signaltransduktionsweges für den
Phagozytose-induzierten Zelltod von
adulten und neonatalen Monozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Graf, Benjamin

2015

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter

Professor Dr. Ch. F. Poets

2. Berichterstatter

Professor Dr. B. Sipos

für Dunia und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Neugeborenenensepsis	1
1.2 Phagozytose-induzierter Zelltod	2
1.3 Bedeutung der apoptotischen Signaltransduktionswege für den PICD	3
1.4 Bcl-2-Proteine als Regulatoren der Apoptose	4
1.5 Ziel der Arbeit	5
2 Material	6
2.1 Zellen	6
2.2 Materialien biologischen Ursprungs	6
2.3 Materialien nicht-biologischen Ursprungs	7
2.4 Monoklonale Antikörper zur durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Analyse	8
2.5 Kits zur Durchführung der Realtime-PCR	9
2.6 Primer der Realtime-PCR	10
2.7 Geräte	10
2.8 Glas- und Plastikmaterial	12
3 Methoden	13
3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut	13
3.2 Monozytenseparation durch magnetic cell sorting (MACS)	13
3.3 Zellzahlbestimmung	14
3.4 Kultivierung der MNC mit <i>E. coli</i>	14

3.5	Kultivierung der MNC mit Mitomycin	15
3.6	Fixierung und Permeabilisierung der MNC	15
3.7	Färbung von Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bax 6A7 und Bim	16
3.8	Anfärben der Mitochondrien mit Mito-Tracker	17
3.9	Messung der mRNA-Expression von Bcl-xL, Bid, Mcl-1, Bax und Bim durch Realtime-PCR	17
3.9.1	RNA-Extraktion	18
3.9.2	DNA Elimination durch DNase	18
3.9.3	PCR zur Kontrolle der Reinheit der RNA	18
3.9.4	Auftrennung der Proben im Agarose-Gel	19
3.9.5	Photometrische Messung der RNA-Menge	19
3.9.6	cDNA-Synthese	19
3.9.7	Präamplifikation	20
3.9.8	Realtime-PCR	20
3.10	Mess- und Auswertungsmethoden	21
3.10.1	Durchflusszytometrie	21
3.10.2	Fluoreszenzmikroskopie	23
3.11	Statistische Analyse	24
4	Ergebnisse	25
4.1	mRNA-Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo	25
4.2	Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo	27
4.2.1	Bcl-xL-Expression in PBMo und CBMo	28
4.2.2	Bcl-2-Expression in PBMo und CBMo	32
4.2.3	Bax-Expression in PBMo und CBMo	34
4.2.4	Bim-Expression in PBMo und CBMo	38
4.3	Bestimmung des Cytochrom c-Austritts aus Mitochondrien in PBMo und CBMo	39
5	Diskussion	43
5.1	mRNA-Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo	43
5.2	Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo	45

5.2.1	Bcl-xL-Expression in PBMo und CBMo	45
5.2.2	Bcl-2-Expression in PBMo und CBMo	48
5.2.3	Bax-Expression in PBMo und CBMo	48
5.2.4	Bim-Expression in PBMo und CBMo	50
5.3	Bestimmung des Cytochrom c-Austritts aus Mitochondrien in PBMo und CBMo	52
5.4	Bedeutung des intrinsischen Apoptoseweges für den PICD von Mo	54
5.5	Diskussion der Methoden	56
6	Zusammenfassung	58
7	Literaturverzeichnis	60
8	Veröffentlichungen	68
9	Erklärung zum Eigenanteil	69
10	Danksagung	70
11	Lebenslauf	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gaten der Mo-Population und Immunphänotypisierung des CD 14 Rezeptors	22
Abbildung 2: Die mRNA-Expression von Bcl-xL ist in CBMO höher als in PBMo	26
Abbildung 3: Das Verhältnis pro-apoptotischer zu anti-apoptotischer Proteine ist in CBMo geringer als in PBMo	27
Abbildung 4: Bcl-xL wird in Mo nach <i>E. coli</i> ^{GFP} -Infektion herunterreguliert	28
Abbildung 5: Bcl-xL wird nach Infektion mit <i>E. coli</i> ^{GFP} von einem geringeren Prozentsatz PBMo und CBMo exprimiert	29
Abbildung 6: CBMo exprimieren weniger Bcl-xL als PBMo	29
Abbildung 7: Bcl-xL ist in PBMo sowohl mitochondrial als auch cytosolisch verteilt	31
Abbildung 8: Bcl-xL ist in CBMo sowohl mitochondrial als auch cytosolisch verteilt	32
Abbildung 9: Nach Infektion mit <i>E. coli</i> ^{GFP} wird Bcl-2 von einem größeren Prozentsatz PBMo exprimiert als von CBMo	33
Abbildung 10: CBMo exprimieren weniger Bcl-2 als PBMo	33
Abbildung 11: Bax wird nach Infektion mit <i>E. coli</i> ^{GFP} von einem größeren Prozentsatz PBMo und CBMo exprimiert	34
Abbildung 12: Die Expression von Bax ist in PBMo und CBMo nach Infektion mit <i>E. coli</i> ^{GFP} gesteigert	35
Abbildung 13: Bax wird nach <i>E. coli</i> ^{GFP} -Infektion hochreguliert	36

Abbildung 14: Der Anteil der Bax 6A7-positiven Ereignisse unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo	37
Abbildung 15: Die Expression des Bax-Fragmentes 6A7 unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo	37
Abbildung 16: Der Anteil der Bim-positiven Ereignisse unterscheidet sich zwischen PBMo und CBMo nicht	38
Abbildung 17: Die Expression von Bim unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo	39
Abbildung 18: Das intrazelluläre Verteilungsmuster von Cytochrom c unterscheidet sich zwischen PBMo mit und ohne einstündiger <i>E. coli</i> ^{GFP} -Infektion und 24-stündiger Mitomycin-Behandlung	41

:

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Primersequenzen	10
Tabelle 2: PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung zeigen zu einem größeren Prozentsatz ein cytosolisches Verteilungsmuster von Cytochrom c als PBMo nach einstündiger <i>E. coli</i> ^{GFP} -Infektion und PBMo ohne <i>E. coli</i> ^{GFP} -Infektion	42

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AIF	engl. "apoptosis-inducing factor"
Apaf-1	engl. "apoptotic protease activating factor 1"
APC	Allophycocyanin
Bak	engl. "Bcl-2 homologous antagonist/killer"
Bax	engl. "Bcl-2 associated X protein"
Bcl-2	engl. "B-cell lymphoma 2"
Bcl-xL	engl. "B-cell lymphoma xL"
BDP	Bronchopulmonale Dyplasie
BH	engl. "Bcl-2 homology domains"
BH3-only	Proteine der Bcl-2-Familie, die nur die BH3 Domäne exprimieren
Bid	engl. "BH3 interacting domain death agonist"
Bim	engl. "Bcl-2-interacting mediator of cell death"
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CBMC	engl. "cord blood mononuclear cells" (Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut)
CBMo	engl. "cord blood monocytes" (Monozyten aus Nabelschnurblut)
CD14	engl. "cluster of differentiation 14"
CD95	engl. "cluster of differentiation 95" (CD95 Rezeptor)
CD95L	CD95Ligand
sCD95L	engl. "soluble CD95L" (lösliche Form des CD95Ligand)
cDNA	engl. "complementary DNA"
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy5	Cyanin 5

d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	engl. "desoxyribonucleic acid" (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	lat. "et alia" (und andere)
Fa.	Firma
FACS	engl. "fluorescence activated cell sorting"
FACSCalibur	engl. "fluorescence activated cell sorter" (Modell Calibur)
FCS	engl. "fetal calf serum" (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	engl. "forward scatter" (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigungskonstante
GBS	Gruppe B Streptokokken, <i>Streptococcus agalactiae</i>
GFP	engl. "green fluorescent protein"
h	Stunde
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoff
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IMM	engl. "inner mitochondrial membrane" (innere mitochondriale Membran)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	engl. "lysogeny broth"-Medium
LS-Säulen	magnetische Zellseparationssäule
MACS	engl. "magnetic cell sorting" (magnetische Zellseparation)
Mcl-1	engl. "Myeloid cell leukemia-1"
MFI	engl. "mean fluorescent intensity" (mittlere Fluoreszenzintensität)
mg	Milligramm

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA	engl. "micro ribonucleic acid"
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
MNC	engl. "mononuclear cells" (mononukleäre Zellen)
Mo	engl. "monocytes" (Monozyten)
MOI	engl. "multiplicity of infection"
mRNA	engl. "messenger ribonucleic acid"
MS-Säulen	magnetische Zellseparationssäule
Mφ	Makrophagen
n	Anzahl der Versuche
NaN ₃	Natriumazid
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OD600nm	engl. "optical density 600nm"
Oligo dT	Oligo-desoxythymidin
OMM	engl. "outer mitochondrial membrane" (äußere mitochondriale Membran)
p.i.	lat. "post infectionem" (nach einer Infektion)
PBMC	engl. "peripheral blood mononuclear cells" (periphere mononukleäre Zellen Erwachsener)
PBMo	engl. "(peripheral blood monocytes" (Monozyten aus peripherem Blut Erwachsener)
PBS	engl. "phosphate buffered saline" (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PE	Phycoerythrin
PICD	engl. "phagocytosis induced cell death" (Phagozytose-induzierter Zelltod)
PPIB	Peptidylprolyl-Isomerase B

PVL	Periventriculäre Leukomalazie
p-Wert	Signifikanzwert
Realtime-PCR	engl. "realtime polymerase chainreaction" (Realtime-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	engl. "ribonucleic acid" (Ribonukleinsäure)
ROS	engl. "reactive oxygen species" (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	engl. "rounds per minute"
SDH	Succinatdehydrogenase
Smac/Diablo	engl. "Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI"
sog.	sogenannt
SSC	engl. "sideward scatter" (Seitwärtsstreulicht)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
u.a.	unter anderem
VLE	engl. "very low endotoxin"
vs.	lat. "versus" (gegenüber gestellt)
z.B.	zum Beispiel
Zap 70	engl. "zeta-chain-associated protein kinase 70"

1 Einleitung

1.1 Neugeborenenensepsis

Die Sepsis des Neu- und Frühgeborenen stellt eine Hauptursache für Mortalität und Morbidität in dieser Altersgruppe dar (Benjamin et al. 2006, Schrag et al. 2006, Stoll et al. 2010) und gilt als Risikofaktor für die Entstehung von inflammatorischen Folgeerkrankungen wie Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) oder Periventrikuläre Leukomalazie (PVL), die nur während der Neonatalzeit entstehen (Adams-Chapman et al. 2006, Bartels et al. 2005, Bracci et al. 2003, Holcroft et al. 2003, Hentschel et al. 2005, Tapia et al. 2006). Zu den möglichen Ursachen dieser Folgeerkrankungen zählt die Unfähigkeit des neonatalen Organismus die übermäßige Inflammation zu terminieren, wobei die Pathophysiologie dieses Vorgangs noch nicht geklärt ist (Leviton et al. 2011).

Für die Regulation des Immunsystems im Rahmen einer Sepsis ist der programmierte Zelltod (Apoptose) von grundlegender Bedeutung (Hotchkiss et al. 2003, Wesche et al. 2005). So führt ein apoptotischer Verlust von Lymphozyten und dendritischen Zellen zu einem schweren Krankheitsverlauf und ist mit einem schlechten Outcome assoziiert (Hotchkiss et al. 2006).

Monozyten (Mo) und Makrophagen (M ϕ) sind neben Neutrophilen Granulozyten die Haupteffektorzellen zur bakteriellen Eliminierung und sterben nach Beseitigung der bakteriellen Pathogene durch Apoptose (Feig et al. 2007). Eine verminderte Apoptoserate von Mo und M ϕ führt zu einer übermäßigen Inflammation und ist ebenso mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert (Giamarellos-Bouboulis et al. 2006). Daher ist die Balance zwischen Überleben und Apoptose von Effektorzellen des Immunsystems für das Outcome von Sepsispatienten von maßgeblicher Bedeutung (Pinheiro da Silva et al. 2009, Schultz et al. 2004). Wann und wieso es zu einer Dysregulation in diesem Gleichgewicht bei Neu- oder Frühgeborenen kommt, ist derzeit noch unklar und bedarf intensiver Forschung.

1.2 Phagozytose-induzierter Zelltod

Unter physiologischen Bedingungen wird die Phagozytose-Aktivität von Mo und M ϕ durch Apoptose limitiert, ein Vorgang der Phagozytose-induzierter Zelltod (phagocytosis induced cell death, PICD) genannt wird. Der PICD stellt einen wichtigen Faktor zur Beendigung einer Immunreaktion dar, wie bei Infektionen mit verschiedenen Bakterienspezies nachgewiesen werden konnte (DeLeo 2004, Grage-Griebenow et al. 1998, Savill 2000). Bisher ist unklar, durch welche Mechanismen PICD ausgelöst wird.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten nachweisen, dass adulte Monozyten (peripheral blood monocytes, PBMo) und neonatale Monozyten (cord blood monocytes, CBMo) sich in ihrer postphagozytären Reaktion unterscheiden, obwohl die Phagozytose-Rate nicht verschieden war (Gille et al. 2008, Gille et al. 2009a). CBMo betrieben signifikant weniger PICD als PBMo nach Infektion mit den beiden häufigsten Pathogenen der neonatalen Sepsis, *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B Streptokokken, GBS) (Stoll et al. 2002). Des Weiteren wurden die Effektorcaspasen 8 und 9 weniger stark aktiviert, wodurch die überlebenden CBMo in der Lage waren vermehrt proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Außerdem konnten Gille et al. (2009b) nachweisen, dass CBMo eine verminderte Aufnahmefähigkeit von apoptotisch untergegangenen Neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu PBMo haben und dadurch eine verringerte Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen stattfindet. Daher konnten CBMo die Immunreaktion schlechter terminieren als PBMo.

Diese Merkmale wurden als mögliche Auslöser der übermäßigen und verlängerten Inflammation in der Neugeborenenensepsis in Zusammenhang mit Folgeerkrankungen wie BPD und PVL gebracht. Welche Ursache der Apoptoseresistenz zu Grunde liegt, ist bisher nicht bekannt.

1.3 Bedeutung der apoptotischen Signaltransduktionswege für den PICD

Der programmierte Zelltod ist ein wesentliches Element, um die Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten. So ist beispielsweise die kurze Lebensdauer von Neutrophilen Granulozyten durch Apoptose bestimmt (DeLeo 2004). Eine inter- und intrazelluläre Regulation von Zellproliferation und Apoptose ist notwendig, um die Homöostase zu garantieren.

Es existieren drei Signaltransduktionswege, um Apoptose einzuleiten (Böhm et al. 2003, Pinheiro da Silva et al. 2009). Der extrinsische Weg wird über sog. Todesliganden wie CD95L (Fas-Ligand) oder Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) vermittelt. Nach para- oder autokriner Wirkung der löslichen Faktoren am jeweiligen Todesrezeptor kommt es zur Aktivierung von Caspase 8, welche die Effektorcaspase 3 aktiviert (Ashkenazi et al. 1998). Beim intrinsischen Weg kommt es zur Reaktion der Mitochondrien auf intrazellulären Stress, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder fehlgefaltete Proteine. Proteine der Bcl-2-Familie regulieren die Transduktion des intrazellulären Stresses zum Mitochondrium und führen zur Freisetzung von Cytochrom c, welches über Bindung an Apaf-1 zur Caspasenaktivierung führt (Böhm et al. 2003, Hotchkiss et al. 2006, Hüttemann et al. 2011, Li et al. 1997, Saleh et al. 1999). Der dritte Weg führt über Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums zur Aktivierung von Caspase 12 und mündet in den intrinsischen Weg. Die Aktivierung der Caspasen führt letztendlich zu einer DNA-Fragmentation (Cain et al. 1999, Pinheiro da Silva et al. 2009).

Die eigene Arbeitsgruppe konnte die Bedeutung des extrinsischen Weges für den PICD bereits mehrfach nachweisen (Gille und Dreschers et al. 2013, Dreschers und Gille et al. 2013, Gille et al. 2008). Dabei konnte aufgedeckt werden, dass CBMo nach Infektion mit *Escherichia coli* vor allem weniger Todesliganden sezernierten als PBMo und dass ein erheblicher Anteil der apoptotischen Mo nicht direkt am Phagozytose-Vorgang beteiligt war. Für diesen sog. Bystander-Zelltod konnte vor allem die Relevanz von TNF- α herausgestellt werden. Allerdings konnte der verminderte PICD von CBMo gegenüber PBMo nicht vollständig durch den extrinsischen Transduktionsweg

zur Auslösung von Apoptose erklärt werden, sodass ebenso Unterschiede im intrinsischen Weg vermutet wurden. Bisher ist unklar, ob Alterationen im intrinsischen Apoptoseweg für den verminderten PICD von CBMo mitverantwortlich sind.

1.4 Bcl-2-Proteine als Regulatoren der Apoptose

Die Bcl-2-Proteinfamilie, benannt nach dem Prototyp „B-cell-lymphoma 2“ (Bcl-2), gehört zu den zentralen Regulatoren der Apoptose (Chan et al. 2004, Chipuk et al. 2010). Dazu zählen mehrere Proteine, die in pro- und anti-apoptotische Kategorien eingeteilt werden können. Zu den anti-apoptotischen Proteinen gehört u.a. Bcl-2, „B-cell lymphoma xL“ (Bcl-xL) und „Myeloid cell leukemia-1“ (Mcl-1). Alle Bcl-2-Proteine besitzen ein bis vier charakteristische Strukturmerkmale, sogenannte Bcl-2 homology domains (BH-Domänen), die bei allen Proteinen der Familie identisch sind. Die anti-apoptotischen Proteine besitzen alle vier BH-Domänen und üben ihre Wirkung aus, indem pro-apoptotische Proteine in ihrer Funktion gehemmt werden (Chan et al. 2004, Chipuk et al. 2008a, Ewings et al. 2007b, Petros et al. 2004, Wong et al. 2008). Die pro-apoptotischen Proteine untergliedern sich in zwei Gruppen, Modulatoren und Effektoren. Effektoren wirken direkt auf die äußere mitochondriale Membran (outer mitochondrial membrane, OMM) ein, während die Modulatoren entweder anti-apoptotische Proteine hemmen oder Effektorproteine aktivieren (Chipuk et al. 2010, Wong et al. 2008). Zu den Effektorproteinen gehört u.a. „Bcl-2-associated x protein“ (Bax), welches drei BH-Domänen besitzt, in der OMM oligomerisieren kann und so zur Permeabilisierung der Membran führt (Annis et al. 2005, Bleicken 2008, Chipuk et al. 2008b, Dewson et al. 2009, Peyerl et al. 2007). Die Permeabilisierung stellt eine Voraussetzung für die Freisetzung von Cytochrom c dar (Chipuk et al. 2008b, Kroemer et al. 2007, Ott et al. 2002). Zu den Modulatoren werden u.a. „Bcl-2-interacting mediator of cell death“ (Bim) und „BH3 interacting domain

death agonist" (Bid) gerechnet. Die Modulatoren werden auch BH3-only Proteine genannt, da sie nur die BH3-Domäne besitzen (Chipuk et al. 2008b, Czabotar et al. 2009, Kirschnek et al. 2005, Willis et al. 2007).

Die genauen Wechselwirkungen der verschiedenen Proteine und ihre Effekte im Hinblick auf Apoptose-Auslösung sind nicht vollständig geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Es gibt jedoch mehrere Hinweise, dass der intrinsische Apoptoseweg eine Relevanz für den PICD von Monozyten hat (Albee et al. 2007, Häcker et al. 2002, Kirschnek et al. 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, inwieweit Funktionsunterschiede im intrinsischen Apoptoseweg den PICD von neonatalen und adulten Monozyten nach Interaktion mit *E. coli* bedingen. Dazu sollten die Hypothesen untersucht werden, dass (1) CBMo weniger pro-apoptische Proteine synthetisieren und exprimieren als PBMo, dass (2) CBMo mehr anti-apoptische Proteine synthetisieren und exprimieren als PBMo und dass (3) CBMo weniger Cytochrom c freisetzen als PBMo.

Um diese Fragestellungen zu klären wurden PBMo und CBMo in einem *in vitro* Infektionsmodell mit green-fluorescent-protein (GFP) markierten *Escherichia coli* (*E. coli*^{GFP}) infiziert und die Expression der Bcl-2-Proteine auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene mittels Realtime-PCR, Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie gemessen. Des Weiteren wurde fluoreszenzmikroskopisch die Freisetzung von intramitochondrialem Cytochrom c ins Cytosol analysiert.

2 Material

2.1 Zellen

Es wurden mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherenvenösem Blut gesunder Erwachsener und aus Nabelschnurblut reifer Neugeborener gewonnen. Bei den erwachsenen Spendern bestanden weder akute noch chronische Erkrankungen. Es wurde nur Nabelschnurblut reifer Neugeborener ohne Anzeichen einer pränatal erworbenen Infektion verwendet. Die Blutentnahme aus der Nabelschnur erfolgte durch sterile Punktion nach vorangegangener schriftlicher Einwilligung der Mutter sowie der Genehmigung durch die Ethikkommission (Nummer des Ethikvotums 248/2005A).

2.2 Materialien biologischen Ursprungs

Bovines Serum Albumin(BSA), lyophilisiert	Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
dNTP Mix 2mM	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot
<i>E. coli</i> DH5 α (GFP)-mut2	(Dehio et al. 1998)
Fetales Kälberserum (FCS), inaktiviert im 56°C Wasserbad für 30 Minuten	Fa. Biochrom, Berlin
Kanamycin	Fa. Sigma, Taufkirchen
Mitomycin	Fa. Medac, Wedel
Oligo dT Primer	Fa. Promega, Mannheim
Random Primer	Fa. Promega, Mannheim
Saponin	Fa. Sigma, Taufkirchen

2.3 Materialien nicht-biologischen Ursprungs

2% LB (lysogeny broth)- Medium in Ampuwa	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Fa. AppliChem, Darmstadt
Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg
Biocoll Separating Solution	Fa. Biochrom, Berlin
Cytofix/Cytoperm™	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Fa. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. AppliChem, Darmstadt
GelRed Nucleic Acid Stain	Fa. Biotrend, Köln
Gentamicin	Fa. Sigma, Taufkirchen
Heparin-Natrium (5000 I.E./ 0,5ml)	Fa. Braun, Melsungen
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Light Cycler CyberGreen	Fa. Roche, Grenzach- Wyhlen
Mass Ruler Low Range DNA Ladder	Fa. Fermentas, St. Leon- Rot
Mowiol	Fa. Sigma, Taufkirchen
Natriumazid NaN ₃ 20 %	Fa. Sigma, Taufkirchen
PBS-Dulbecco (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Fa. Biochrom, Berlin
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Fa. Promega, Mannheim
Running Buffer	Universitätsapotheke, Tübingen
Saponinpuffer (2,5g BSA, 0,5 Gramm Saponin, 0,02% NaN ₃ (20%ig) in 500ml PBS)	
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	Fa. AppliChem, Darmstadt
TriTrack DNA Loading Dye	Fa. Fermentas, St. Leon- Rot
Tryphanblau	Fa. Biochrom, Berlin

VLE RPMI (Very Low Endotoxin, Roswell Park Memorial Inst.) 1640 Medium mit L-Glutamin
Waschpuffer (0,5 Gramm BSA, 1ml NaN₃(20%ig)
in 500 ml PBS)

Fa. Biochrom, Berlin

2.4 Monoklonale Antikörper zur durchflusszytometrischen und fluoreszenz- mikroskopischen Analyse

Mitochondriale Antikörper:

Mito-Tracker Deep Red FM 633

Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Mito-Tracker Red CMXRos

Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiert:

CD14; M ϕ P9, IgG_{2b}

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Phycoerythrin (PE)-markiert:

CD14; M ϕ P9, IgG_{2b}

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Isotype control; IgG_{1k} (Isotyp)

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Zap 70; 1E7.2

Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Bcl-2; Bcl-2/100

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Bcl-xL; H-5

Fa. Santa Cruz
Biotechnology, Inc.,
Heidelberg

Goat-anti-Mouse IgG; H+L

Fa. Imgenex, San Diego,
USA

Alexa Fluor 647-markiert:

CD14; MφP9, IgG_{2b}

Anti-Rabbit-IgG; H+L

Bax; B-9

Cytochrom c; 6H2.B4 (Cyt c)

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Fa. Cell Signaling
Technology, Inc., Danvers
(USA)

Fa. Santa Cruz
Biotechnology, Inc.,
Heidelberg

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Ungelabelte Antikörper:

Bax 6A7; ab 5714

Bim; C34C5

Fa. Abcam, Heidelberg

Fa. Cell Signaling
Technology, Inc., Danvers
(USA)

2.5 Kits zur Durchführung der Realtime-PCR

CD14 MicroBeads

RNeasy Mini 50

DNase I RNase free

Reverse Transcriptase SuperScript

(5-fach Puffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM

KCl, 15 mM MgCl₂], Dithiothreitol (DTT) 100mM)

TaqMan PreAmp Mastermix

Fa. Miltenyi Biotec,
Bergisch Gladbach

Fa. Qiagen, Hilden

Fa. Fermentas, St. Leon-
Rot

Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Primersequenzen

Name	sense (5' nach 3')	antisense (5' nach 3')	Produktgröße (bp)
Bcl-XL	gta gtg aat gaa ctc ttc cg	gta tcc cag ccg ccg ttc tc	193
Bax	gac gtg ggc att ttt ctt ac	gtg tcc cga agg agg ttt at	158
Bim	gag cca caa gac agg agc	cca ttg cac tga gat agt gg	99
Mcl-1	ctc tca ttt ctt ttg gtg cct	att cct gat gcc acc ttc ta	193
Bid	tgg tgt ttg gct tcc tcc aa	gaa tct gcc tct att ctt ccc	168
PDH	ggg ttc cca ttc aag acc tg	tgg ttt cca tgt cca ttg gt	119
SDH	aga agc cct ttg agg cag ca	cga tta cgg gta tat att cca ga	93
PPIB	aag ggg ccc aaa gtc acc gtc aag	ggg gaa gcg ctc acc gta gat gc	261

2.7 GeräteBrutschrank (5% CO₂)Fa. Heraeus Instruments,
Stuttgart

Cell Quest Software

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Cytospin 2

Fa. Shandon GmbH,
Frankfurt/Main

E.A.S.Y. Win Software

Fa. Herolab, Wiesloch

Eppendorf Zentrifuge 5415C

Fa. Eppendorf, Hamburg

FACSCalibur (fluorescence activated cell sorter)

Fa. Becton Dickinson,
Heidelberg

Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging

Fa. Zeiss, Oberkochen

Heizblock

Fa. Eppendorf, Hamburg

Herolab E.A.S.Y. 440k

Fa. Herolab, Wiesloch

Isis Software	Fa. Meta Systems, Altlussheim
Kühlschrank	Fa. Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
Light Cyclers 3.0	Fa. Roche, Grenzach- Wyhlen
REST 2009 V2.0.13 Software	Fa. Qiagen, Hilden
OctoMACS™ Separator	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Photometer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipetten (1, 10, 20, 100, 200, 1000µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Fa. Brand, Wertheim
QuadroMACS™ Separator	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Schüttelmixer Certomat H	Fa. B. Braun Biotech International, Göttingen
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Sysmex KX-21N	Fa. Sysmex GmbH, Norderstedt
Thermal Cyclers MJ Research	Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf
Vortex	Fa. Schütt, Göttingen
Waage	Fa. Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Fa. GFL GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Rotanta 46S und 460 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

2.8 Glas- und Plastikmaterial

6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch Kulturplatten	Fa. Costar, Bodenheim
Safety-Multifly-Set	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Tubes	Fa. Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Kuvetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
LS Säulen	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MS Säulen	Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Fa. Hecht Assistent, Sondheim
Pipettenspitzen (10-, 100-, 1000µl)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Superfrost Plus Objektträger	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
Zentrifugenröhrchen (15- , 50ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen

3 Methoden

3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut

Die mononukleären Zellen (MNC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum (1968; 1977) aus dem Vollblut erwachsener Spender (PBMC) und aus Nabelschnurblut (CBMC) gewonnen. Zur Gerinnungshemmung wurden 4 I.E. Heparin/ml Blut verwendet. Das Blut wurde jeweils 1:1 mit PBS verdünnt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen ohne Durchmischung auf 15 ml Biocoll Trennlösung geschichtet. Es folgte die Zentrifugation mit 400g bei 20°C über 25 Minuten ohne Bremse. Der entstandene Zellring, bestehend aus MNC, wurde mit einer 10ml Pipette abgesaugt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde bei 500g über 10 Minuten bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 25 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung mittels Sysmex KX-21, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 400g bei 4°C über 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.2 Monozytenseparation durch magnetic cell sorting (MACS)

Durch magnetische Zellseparation können Monozyten (Mo) aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle aus einer Zellsuspension von MNC isoliert werden. Dazu werden Antikörper gegen den CD14-Rezeptor verwendet, die mit Eisenmolekülen gekoppelt sind (MicroBeads). Die MNC werden in eine Separationssäule gefüllt, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, sodass alle an MicroBeads-gebundenen Zellen zurückgehalten werden und alle nicht-gebundenen Zellen die Säule durchfließen können. Die Versuche wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Fa. Miltenyi Biotec) durchgeführt.

Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde durch eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie überprüft und betrug zwischen 92% und 97% (Daten nicht gezeigt).

3.3 Zellzahlbestimmung

Vor der Kultivierung der MNC in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, um eine Einstellung auf 2×10^6 Zellen/ml zu gewährleisten. Die Messung erfolgte durch ein automatisches Hämozytometer (Sysmex KX-21). Die Messgenauigkeit wurde durch manuelle Zählung in der Neubauer Zählkammer validiert. Beide Methoden unterscheiden sich in ihrer Genauigkeit um weniger als 10% (Daten nicht gezeigt).

3.4 Kultivierung der MNC mit *E. coli*

Die MNC wurden in zwei Ansätze unterteilt, wobei ein Zellansatz mit *Escherichia coli* DH5 α beimpft wurde.

E. coli DH5 α ist ein Bakterienstamm, der das green-fluorescence-protein (gfp)-Gen plasmidkodiert trägt. Es wird durch den lactat-Promotor reguliert. Die Bakterien wurden aus der -80°C Gefrierkultur in 5 ml LB-Medium überführt und unter Zugabe von 30 μ g/ml Kanamycin und 1mmol/l IPTG über Nacht bei 37°C mit 200 rounds per minute (rpm) geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 100 μ l der Bakteriensuspension in 5 ml neues LB-Medium pipettiert und für weitere 2-4 Stunden im Schüttelmixer bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Diese ist bei $OD_{600nm} = 0,3$ bis $0,7$ erreicht. Dann wurde die Bakterienzahl mittels Spektrophotometrie bestimmt. Dabei gilt: $OD_{600nm} = 1$ entspricht 2×10^6 Bakterien/ μ l. Das Verhältnis der MNC zu Bakterien wurde über die multiplicity of infection (MOI) definiert. Der Zellansatz wurde mit einer MOI von 1:50 inkubiert.

Jeweils beide Zellansätze wurden für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dann wurden die Zellen von den Zellkulturplatten gespült und auf 2ml FCS in 15 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen. Dazu wurde mit 350g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert und verworfen. Je nach Versuchsansatz wurden die MNC entweder unter Gentamicin-Zugabe zur Eliminierung verbleibender Bakterien für eine weitere Dauer in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz im Brutschrank inkubiert oder direkt weiter verarbeitet.

3.5 Kultivierung der MNC mit Mitomycin

Zur Auslösung des intrinsischen Apoptoseweges wurden MNC 24 Stunden mit 1mg/ml Mitomycin behandelt. Dazu wurden die MNC in zwei Ansätze unterteilt, wobei ein Ansatz mit 50µl Mitomycin pro ml Zellsuspension und ein Ansatz ohne Mitomycin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden.

3.6 Fixierung und Permeabilisierung der MNC

Die Bcl-2-Proteinfamilie ist intrazellulär lokalisiert, teils diffus im Zytosol verteilt, teils an membranöse Strukturen gebunden. Um sie den Fluorochromgekoppelten Antikörpern zugänglich zu machen, wurden die MNC mit Cytofix/Cytoperm™-Lösung behandelt. Dadurch war eine gleichzeitige Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Plasmamembranen als Voraussetzung für die Messung der Proteine gegeben.

Nach Überführung der jeweiligen Zellansätze in FACS-Teströhrchen wurden diese mit Waschpuffer bei 4°C und 350g über 5 Minuten gewaschen. Danach wurden 100µl Cytofix/Cytoperm™-Lösung pro Ansatz hinzugegeben. Das Gemisch wurde über 15 Minuten bei 4°C ohne Tageslichteinfluss inkubiert. Danach wurden die jeweiligen Ansätze mit Saponinpuffer über 5 Minuten bei

4°C und 350g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und jedes Zellpellet in 50µl Saponinpuffer resuspendiert.

3.7 Färbung von Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bax 6A7 und Bim

Die entsprechenden 50µl Ansätze wurden mit folgenden Antikörper-Konzentrationen gefärbt:

CD14 FITC	2 µl / 50µl Zellsuspension
CD14 PE	2 µl / 50µl Zellsuspension
CD14 Alexa Fluor 647	2 µl / 50µl Zellsuspension
Isotyp	3 µl / 50µl Zellsuspension
Zap 70	2 µl / 50µl Zellsuspension
Anti-Rabbit-IgG	0,05 µl / 50µl Zellsuspension
Goat-Anti-Mouse-IgG	0,5 µl / 50µl Zellsuspension
Bcl-2	10 µl / 50µl Zellsuspension
Bcl-xL	7 µl / 50µl Zellsuspension
Bax	7 µl / 50µl Zellsuspension
Bim	5 µl / 50µl Zellsuspension
Bax 6A7	5 µl / 50µl Zellsuspension

Die optimalen Antikörper-Konzentrationen konnten durch vorangegangene Titration ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Beurteilung der Anfärbbarkeit intrazellulärer Bestandteile wurde der Isotyp als Negativ-Kontrolle verwendet und Zap 70 als Positiv-Kontrolle zum Nachweis der Intrazellulärfärbung. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen der Sekundär-Antikörper von Bim (Anti-Rabbit-IgG) und Bax 6A7 (Goat-Anti-Mouse-IgG) wurden diese in den entsprechenden Versuchen jeweils separat einem Ansatz zugefügt.

Ansätze mit Antikörpern gegen extrazelluläre Epitope (CD14) wurden 10 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert, Ansätze mit Antikörpern gegen intrazelluläre Epitope wurden 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert.

Danach folgte zweimaliges Waschen mit Saponinpuffer, um überschüssige Antikörper zu eliminieren.

3.8 Anfärben der Mitochondrien mit Mito-Tracker

Das Anfärben der Mitochondrien diente zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisation von Bcl-xL und Cytochrom c mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dabei wurde das Fluoreszenzmuster der Mitochondrien und der Proteine verglichen.

Zur Färbung wurde Mito-Tracker Deep Red FM 633 oder Mito-Tracker Red CMXRos in der Konzentration von 1:2000 auf 2×10^6 MNC/ml hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde überschüssiger Farbstoff mit PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 350g über 5 Minuten ausgewaschen.

3.9 Messung der mRNA-Expression von Bcl-xL, Bid, Mcl-1, Bax und Bim durch Realtime-PCR

Zur Analyse der messengerRNA (mRNA)-Regulation von Bcl-xL, Bax, Bim, Bid und Mcl-1 in CBMo und PBMo wurde die Methodik der Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Es handelt sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, bei dem eine Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäuren möglich ist. Die Realtime-PCR-Versuche wurden von Dr. Anja Leiber durchgeführt.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt.

Pyruvatdehydrogenase (PDH), Succinatdehydrogenase (SDH) und Peptidylprolyl-Isomerase B (PPIB) dienten als Referenzgene, da sie durch die Versuchsbedingungen nicht in ihrer Regulation beeinflusst wurden.

3.9.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion aus den MACS-separierten Mo wurde das Aufreinigungs-Kit RNeasy Mini 50 verwendet. Die Durchführung erfolgte nach ein- bzw. zweistündiger Inkubation der Mo mit und ohne *E. coli* nach Herstellerprotokoll. Eine Zellzahl von $1-2 \times 10^6$ pro Ansatz erwies sich als optimal.

3.9.2 DNA Elimination durch DNase

Um DNA aus den Proben zu eliminieren, wurden die Ansätze mit dem DNase I RNase free-Kit behandelt. Zu 30 μ l Probe wurden 2 μ l DNase und 4 μ l Reaktionspuffer pipettiert. Nach Inkubation im Heizblock bei 37°C für 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μ l EDTA beendet. Die Proben wurden hierfür 12 Minuten bei 70°C inkubiert.

3.9.3 PCR zur Kontrolle der Reinheit der RNA

Zur Überprüfung der Reinheit der Proben wurden Introns des PDH-Gens repräsentativ für alle weiteren Gene durch PCR vervielfältigt.

Zu 1 μ l Probe wurde folgender Mastermix gegeben.

18,5 μ l	Wasser
2,5 μ l	10-fach Puffer
2,5 μ l	dNTP
0,7 μ l	Primer von PDH
0,75 μ l	MgCl ₂
0,25 μ l	Taq DNA Polymerase

Zur Amplifikation wurde ein Thermal Cycler MJ Research verwendet. Ein Amplifikationszyklus setzte sich zusammen aus:

94°C	30 Sekunden
36,3°C	30 Sekunden

72°C 18 Sekunden

Nach Doppelstrang-Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten erfolgten 33 Amplifikationszyklen.

3.9.4 Auftrennung der Proben im Agarose-Gel

Zur Visualisierung von DNA-Verunreinigungen wurden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Gelherstellung wurden 1,5 Gramm Agarose mit 80 ml TAE-Puffer versetzt. GelRed Nucleic Acid Stain diente als Farbstoff, um die Proben sichtbar zu machen. In eine Geltasche wurden 10 µl Probe und 2 µl TriTrack Ladepuffer pipettiert, Mass Ruler Low Range DNA Ladder diente als Größenmarker. Die Gele wurden mittels Transluminations bei einer Wellenlänge von 300 nm im Herolab Easy 440K mit der Software E.A.S.Y Win entwickelt. Verunreinigte Ansätze mit DNA-Spuren wurden erneut einer DNA-Elimination unterzogen.

3.9.5 Photometrische Messung der RNA-Menge

Es wurde 1µl Probe mit 49µl Wasser verdünnt und in Relation zu 50 µl Wasser als Kontrolle photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm der RNA-Gehalt bestimmt.

3.9.6 cDNA-Synthese

Aus der RNA wurde nun durch Reverse Transkription cDNA hergestellt, die in der Realtime-PCR eingesetzt wurde. Zur Anlagerung der Primer an die Proben wurde 1µg RNA eingesetzt, das entsprechende Volumen auf 9µl Wasser aufgefüllt, 1µl Oligo dT und 1µl Random-Primer zugegeben. Im Thermal Cycler

MJ Research wurde die Anlagerung der Primer bei 72°C über 10 Minuten durchgeführt.

Für die nachfolgende cDNA-Synthese einer Probe wurde folgender Mastermix erstellt:

4µl	5-fach Puffer
2µl	DTT 0,1M
5µl	2mM dNTPs
0,5µl	RNasin
1µl	Reverse Transcriptase

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 42°C über 50 Minuten. Anschließend wurden die entstandenen Doppelstränge bei 72°C 15 Minuten getrennt.

3.9.7 Präamplifikation

Zur Vermehrung der gewonnenen cDNA wurde zunächst ein Mix aus allen in der Realtime-PCR verwendeten Primern mit einer Konzentration von 25 nM hergestellt und anschließend zu 2,5 µl Primermix 5µl TaqMan PreAmp Mastermix und 2,5 µl cDNA zugegeben. Im Thermal Cycler MJ Research wurde die cDNA bei 95°C über 10 Minuten denaturiert und dann über 15 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C und 4 Minuten bei 60°C präamplifiziert.

3.9.8 Realtime-PCR

Für die Durchführung der quantitativen Realtime-PCR wurde folgender Mastermix erstellt:

8µl	Wasser
0,25µl	Primer sense
0,25µl	Primer antisense
0,5µl	BSA (BSA 10mg/ml mit Ampuwa 1:10 verdünnt)
9µl	CyberGreen

Dem jeweiligen Mastermix wurden 2 µl Probe zugesetzt. Die PCR erfolgte mittels Light Cycler 3.0. Ein Amplifikationszyklus bestand aus:

95°C	15 Sekunden
58°C	25 Sekunden
72°C	25 Sekunden

Im Anschluss an die Amplifikation wurde die Temperatur langsam abgesenkt, um den Schmelzpunkt der entstandenen PCR-Produkte zu ermitteln. Eine Schmelzkurvenanalyse diente der Bestimmung der Reinheit der Produkte.

Die Datensätze wurden mit der Software REST 2009 V2.0.13 ausgewertet.

3.10 Mess- und Auswertungsmethoden

3.10.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein etabliertes Verfahren zur Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität oder von Oberflächenmarkern dar (Volk 1991).

Die durchflusszytometrischen Versuche wurden mit einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Zur Erfassung und Auswertung der Daten wurde die Cell Quest Software der Firma Becton Dickinson verwendet.

Durch die Beurteilung des emittierten Streulichts konnten tote von lebendigen Zellen, sowie Monozyten von Lymphozyten unterschieden werden. Dazu wurde das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) auf der Abszisse und das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) auf der Ordinate in einer Dot-Plot Graphik dargestellt. Das FSC korreliert mit der Größe der Zellen und das SSC steht im Verhältnis zur Zytoplasmazusammensetzung und gibt Auskunft über die Granularität (Abbildung 1).

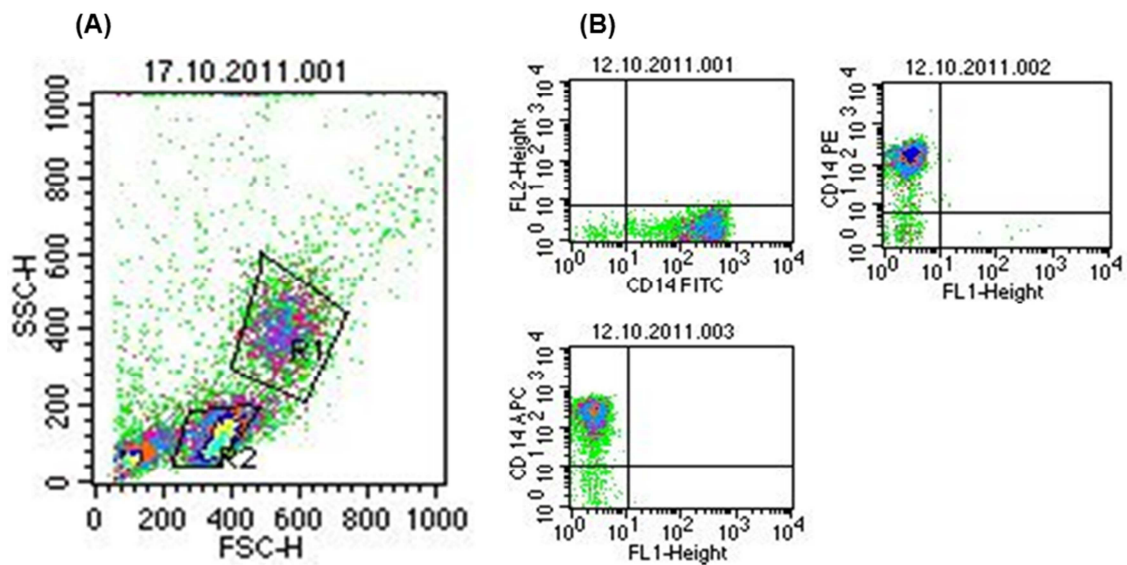


Abbildung 1: Gaten der Mo-Population und Immunphäotypisierung des CD 14 Rezeptors

Repräsentative Dot Plots einer durchflusszytometrischen Messung. Abgebildet ist (A) eine Zelldichteverteilung von MNC nach Größe und Granularität mit Gate R1 = Mo und (B) eine Färbung des CD14 Rezeptors in FITC, PE und Alexa Fluor 647 (hier CD14 APC genannt) der gegateten Zellen, welche zu über 90% positiv waren. Damit konnte eine Verifizierung des Mo-Gates erreicht werden.

Um alle weiteren Messungen nur auf Mo beziehen zu können, wurde in der Dot-Plot Graphik ein Gate über die Mo-Population gelegt. Das Gate konnte verifiziert werden durch die Immunphäotypisierung des CD14-Rezeptors, der als spezifischer Oberflächenmarker von Mo und jungen Makrophagen ($M\phi$) gilt (Wright et al. 1990). Dazu wurden CD14 Antikörper (Klon M ϕ P9; IgG_{2a}) in FITC- und PE- und Alexa Fluor 647-Markierung verwendet und quantitativ gemessen (Abbildung 1).

Zur Auswertung der Messung der Bcl-2-Proteine wurden die Anteile der Protein-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aller gegateten Protein-markierten Mo analysiert.

3.10.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie zur Detektion von Fluorochrom-gekoppelten Zellstrukturen. Das Verfahren wurde angewendet, um Hinweise auf die Lokalisation von Bcl-xL und Cytochrom c zu erlangen.

Voraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie intrazellulär lokalisierter Proteine ist die erhaltene Zellintegrität. Sie wird gewährleistet durch eine Zentrifugation mit geringer Zentrifugalkraft, sodass eine schonende Sedimentation der Zellsuspension auf dem Objektträger stattfindet. Die Zellen werden durch diesen Vorgang abgeflacht, sodass eine zweidimensionale Mikroskopie erleichtert wird (Alberts et al. 2002).

PBMC und CBMC wurden nach einstündiger Inkubation mit und ohne *E. coli*^{GFP} mit Mito-Tracker (Deep Red FM 633 oder Red CMXRos) gefärbt. Anschließend wurde Bcl-xL durch den Bcl-xL-Antikörper H5, PE, und Cytochrom c durch den Cytochrom c-Antikörper B2H6, Alexa Fluor 647, markiert. Nach durchflusszytometrischer Kontrolle der Färbungen wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) versetzt, um die Zellkerne anzufärben. Das Gemisch wurde bei 4°C 5 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend mit Saponinpuffer gewaschen. Die resuspendierte Flüssigkeit wurde in die entsprechenden Kammern gefüllt, welche auf die Objektträger gespannt wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1600 rpm für 2 Minuten. Die Objektträger wurden daraufhin luftgetrocknet und das Zellsediment mit 4 µl Mowiol eingebettet.

Gefärbte Zellkerne konnten durch den DAPI-Filter detektiert werden, gfp-markierte Bakterien wurden über den FITC-Filter erkannt. PE-markierte Epitope konnten durch den TRITC-Filter registriert werden und Alexa-Fluor 647-markierte Epitope wurden durch den Cy5-Filter erfasst.

Alle Aufnahmen sind unter 40-facher Vergrößerung entstanden und teilweise zur besseren Darstellung zusätzlich digital vergrößert worden.

Mo und T-Lymphozyten konnten anhand ihrer charakteristischen Zellkern- und Zytoplasmagröße voneinander differenziert werden, wobei T-Lymphozyten

kleine, runde Zellkerne mit schmalen Zytoplasmasaum besitzen und Mo durch größere unregelmäßige Zellkerne und einen breiteren Zytoplasmasaum gekennzeichnet werden (Lüllmann-Rauch 2006).

3.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung sowohl der durchflusszytometrischen Ergebnisse bezüglich Proteinexpression und Fluoreszenzintensität von PBMo und CBMo, als auch der relativen Expressionswerte der Realtime-PCR wurden der Wilcoxon-Rangsummen-Test und der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zum Vergleich der Mo vor und nach Infektion wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test angewendet, zum Vergleich zwischen PBmo und CBMo wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Die Berechnung wurde mit der freien Software R, Version 2.14.0 für Windows, durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant erachtet.

Die im Text aufgeführten Werte sind Mittelwerte \pm der zugehörigen Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 mRNA-Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo

Um zu ermitteln, ob auf mRNA-Ebene eine Regulation der Bcl-2-Proteine stattfindet, wurden PBMo und CBMo mit *E. coli*^{GFP} inkubiert und die relativen Expressionswerte der mRNA der Bcl-2-Proteine bezogen auf die Expression in nicht-infizierten Zellen durch quantitative Realtime-PCR bestimmt. Indices über 1 zeigen eine Hochregulation der mRNA nach *E. coli*^{GFP}-Infektion an.

Die mRNA-Expression von Bcl-xL in CBMo war nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} hochreguliert. Der Regulationsindex war 2h p.i. signifikant höher als 1h p.i. (Abbildung 2, CBMo 1h p.i. $1,68 \pm 0,23$ vs. CBMo 2h p.i. $4,31 \pm 3,44$, $n=4$, $p < 0,05$). Nach zweistündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion von PBMo war die Bcl-xL-Expression nicht erhöht (Abbildung 2, PBMo 1h p.i. $0,95 \pm 0,34$ vs. PBMo 2h p.i. $0,84 \pm 0,36$, $n=4$, $p > 0,05$). Sowohl nach ein-, als auch nach zweistündiger Infektion mit *E. coli*^{GFP} war die mRNA-Expression von Bcl-xL in CBMo signifikant höher als in PBMo (Abbildung 2, PBMo 1h p.i. $0,95 \pm 0,34$ vs. CBMo 1h p.i. $1,68 \pm 0,23$, $n=4$, $p < 0,05$ und PBMo 2h p.i. $0,84 \pm 0,36$ vs. CBMo 2h p.i. $4,31 \pm 3,44$, $n=4$, $p < 0,05$).

Die mRNA von Bim wurde in PBMo und CBMo nach zweistündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion hochreguliert, die Unterschiede zur einstündigen *E. coli*^{GFP}-Infektion waren jedoch nicht signifikant. Unterschiede zwischen PBMo und CBMo konnten nicht festgestellt werden.

Bei den Bcl-2-Proteinen Mcl-1, Bid und Bax konnten keine Unterschiede in der mRNA-Regulation festgestellt werden.

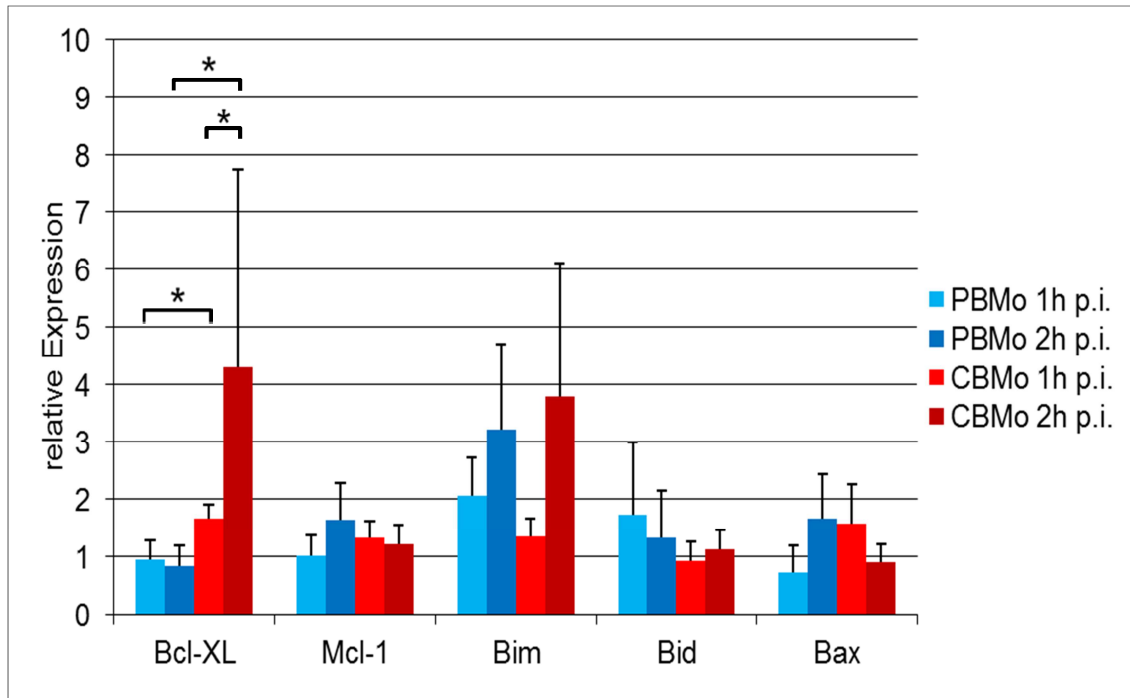


Abbildung 2: Die mRNA-Expression von Bcl-xL ist in CBMo höher als in PBMo

PBMo und CBMo wurden mittels MACS-Separation isoliert und eine Stunde und zwei Stunden mit *E. coli*^{GFP} infiziert, freie Bakterien wurden danach entfernt. Anschließend wurde die Realtime-PCR durchgeführt und die relativen Expressionswerte der mRNA der Bcl-2-Proteinfamilie bestimmt. Als unregulierte Kontrollen dienten die Gensequenzen von Pyruvatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Peptidylprolyl-Isomerase B. Die Versuche wurden von Dr. Anja Leiber durchgeführt. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4, *p<0,05).

Zur Darstellung des pro- und anti-apoptischen Gleichgewichts wurden die relativen Expressionswerte der proapoptischen Proteine Bim und Bax in ein Verhältnis zum anti-apoptischen Protein Bcl-xL gesetzt. In CBMo war der Bax/Bcl-xL-Quotient 2h p.i. im Vergleich zu 1h p.i. deutlich zu Bcl-xL verschoben (Abbildung 3, CBMo 1h p.i. $0,93 \pm 0,37$ vs. CBMo 2h p.i. $0,27 \pm 0,11$, n=4, p<0,05). Bei PBMo war der Bax/Bcl-xL-Quotient 2h p.i. im Vergleich zu 1h p.i. zwar deutlich, jedoch nicht auf dem Signifikanzniveau von p<0,05 zum proapoptischen Protein Bax verschoben (Abbildung 3, PBMo 1h p.i. $0,8 \pm 0,44$ vs. PBMo 2h p.i. $2,15 \pm 0,94$, n=4, p=0,11). 2h p.i. war der Bax/Bcl-xL-Quotient in CBMo signifikant geringer als in PBMo, d.h. in CBMo überwog die mRNA des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL, in PBMo die des pro-apoptischen Proteins

Bax (Abbildung 3, PBMo 2h p.i. $2,15 \pm 0,94$ vs. CBMo 2h p.i. $0,27 \pm 0,11$, $n=4$, $p < 0,05$).

Dies galt auch für den Bim/Bcl-xL-Quotient. Sowohl 1h p.i. als auch 2h p.i. war das Verhältnis der mRNA von Bim/Bcl-xL in CBMo signifikant geringer als in PBMo (Abbildung 3, PBMo 1h p.i. $2,36 \pm 1,11$ vs. CBMo 1h p.i. $0,81 \pm 0,07$, $n=4$, $p < 0,05$ und PBMo 2h p.i. $4,21 \pm 2,36$ vs. CBMo 2h p.i. $1,07 \pm 0,67$, $n=4$, $p < 0,05$).

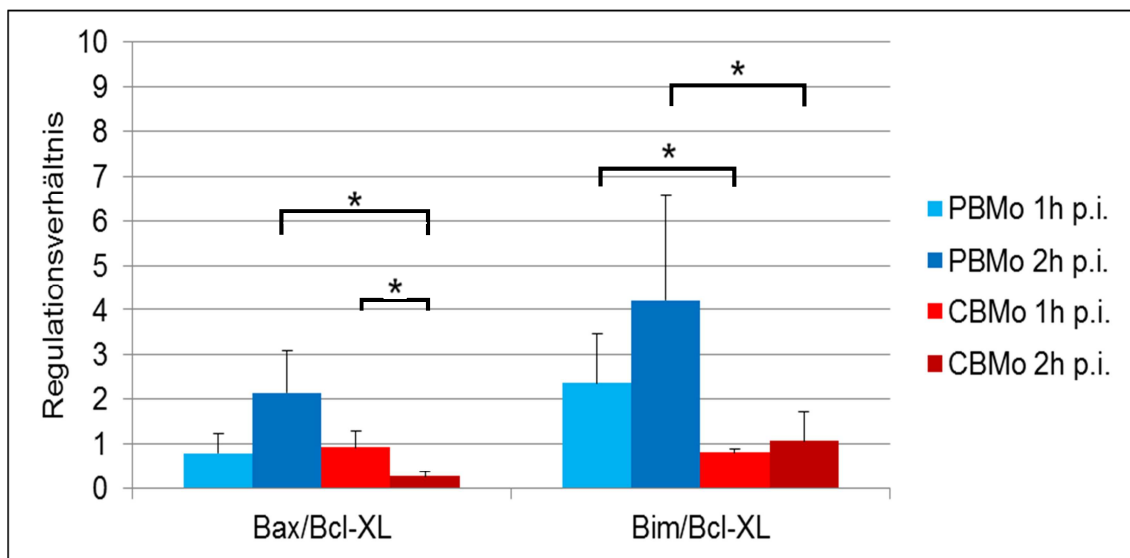


Abbildung 3: Das Verhältnis pro-apoptotischer zu anti-apoptotischer Proteine ist in CBMo geringer als in PBMo

Aus den relativen Expressionswerten der mRNA der Bcl-2-Proteine wurden Verhältnisse von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Proteinen gebildet. Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$, $*p < 0,05$)

4.2 Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo

Um zu untersuchen, ob sich die mRNA-Regulation nach *E. coli*^{GFP}-Infektion auf die Proteinexpression auswirkt, wurden Bcl-2, Bcl-xL, Bax und Bim mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt und die Expression durchflusszytometrisch gemessen.

4.2.1 Bcl-xL-Expression in PBMo und CBMo

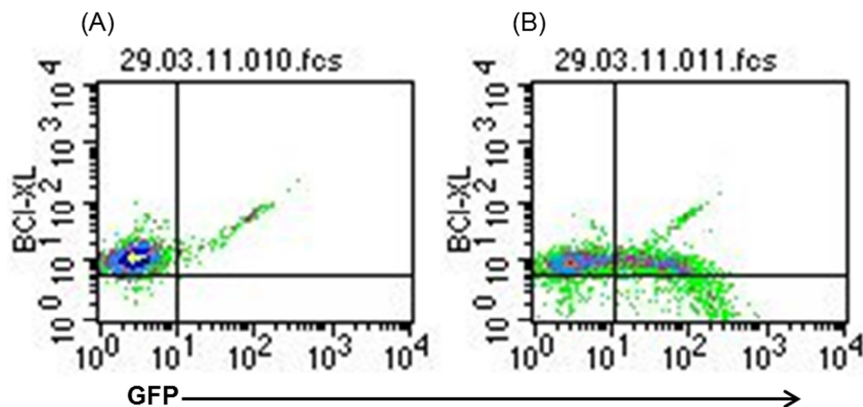


Abbildung 4: Bcl-xL wird in Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion herunterreguliert

Repräsentative Dot Plot Graphiken einer durchflusszytometrischen Messung der Bcl-xL-Färbung. Abgebildet sind Zelldichteverteilungen von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion (A) und PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion (B), wobei auf der Abszisse die GFP-Markierung in logarithmischer Skalierung und auf der Ordinate die Bcl-xL-Markierung in logarithmischer Skalierung dargestellt sind.

Zur Analyse der Bcl-xL-Expression in PBMo und CBMo wurde durchflusszytometrisch die Antikörper-Markierung von Bcl-xL bestimmt. Abbildung 4 zeigt eine repräsentative Messung von PBMo, wobei deutlich wird, dass Bcl-xL nach *E. coli*^{GFP}-Infektion herunterreguliert wurde. Der Anteil an Bcl-xL-positiven Zellen sank nach *E. coli*^{GFP}-Infektion sowohl bei PBMo als auch bei CBMo signifikant ab (Abbildung 5, PBMo 97±2% vs. PBMo 1h p.i. 91±6%, n=6, p<0,05 und CBMo 96±2% vs. CBMo 1h p.i. 89±5%, n=6, p<0,05). Zwischen PBMo und CBMo bestanden keine Unterschiede.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Markierung gibt Auskunft über die zelluläre Proteinexpression der gemessenen Ereignisse. Die MFI der Bcl-xL-Markierung war bei nicht-infizierten CBMo signifikant geringer als bei PBMo (Abbildung 6, PBMo 14±3 vs. CBMo 10±3, n=6, p<0,05). Auch nach *E. coli*^{GFP}-Infektion konnte eine signifikant geringere MFI bei CBMo als bei PBMo festgestellt werden (Abbildung 6, PBMo 1h p.i. 13±4 vs. CBMo 1h p.i. 8±3, n=6, p<0,05).

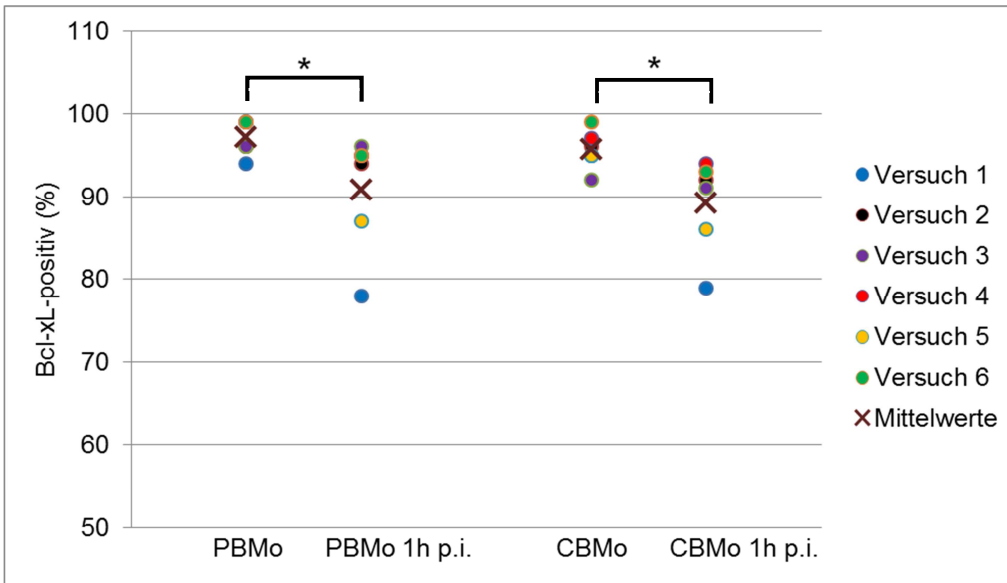


Abbildung 5: Bcl-xL wird nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} von einem geringeren Prozentsatz PBMo und CBMo exprimiert

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, freie Bakterien danach entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde der Anteil der Bcl-xL-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6, *p<0,05)

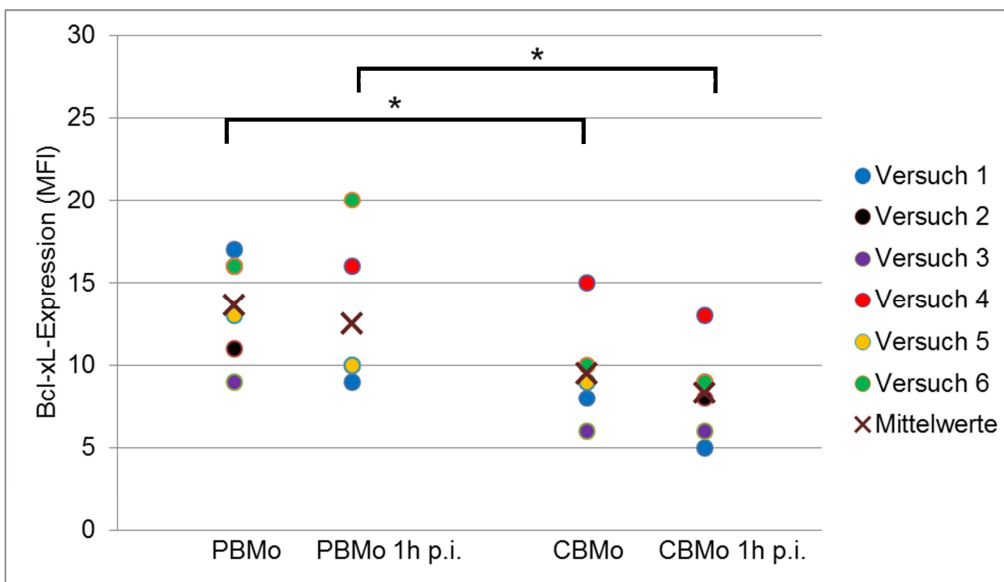


Abbildung 6: CBMo exprimieren weniger Bcl-xL als PBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, freie Bakterien danach entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde die MFI der Bcl-xL-Markierung bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6, *p<0,05)

Da die Aktivität der Bcl-2-Proteine wesentlich von ihrer Lokalisation in der Zelle abhängig ist, wurde die Verteilung von Bcl-xL in PBMo und CBMo fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden Mitochondrien mit Mito-Tracker Deep Red FM 633 gefärbt und deren Verteilungsmuster mit dem von Bcl-xL verglichen (Abbildung 7 und 8).

Abbildung 7 zeigt Aufnahmen von PBMo. In (A) und (B) sind gleiche Bildausschnitte von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion dargestellt, wobei unterschiedliche Filter zur Anwendung kamen. Das Verteilungsmuster von Bcl-xL (rot in (A)) deckt sich mit dem Verteilungsmuster von Mitochondrien (grün in (B)), wobei die Markierung der Mitochondrien deutlich distinkter erscheint als die Markierung von Bcl-xL. Dieses Verteilungsmuster von Bcl-xL deutet darauf hin, dass das Protein in naiven PBMo sowohl im Cytosol als auch an Mitochondrien gebunden vorliegt. In (C) und (D) sind PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion zu erkennen. In grün sind *E. coli*^{GFP} dargestellt. Das Verteilungsmuster von Bcl-xL (rot) erscheint deutlich diffuser als in (A), was darauf hinweist, dass Bcl-xL in PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion vermehrt im Cytosol lokalisiert ist.

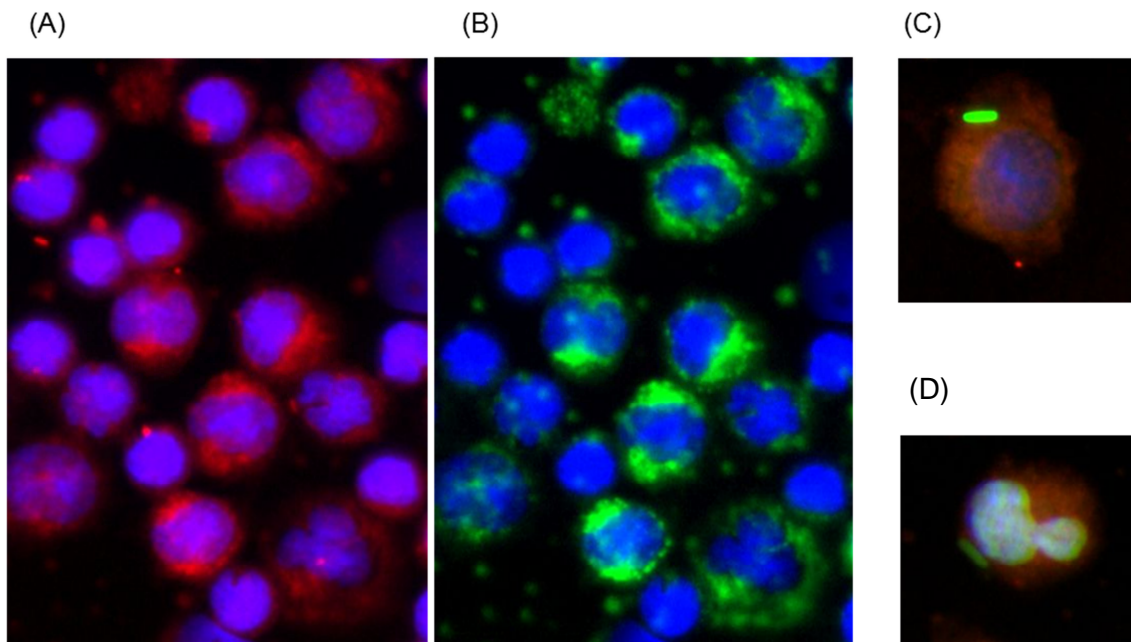


Abbildung 7: Bcl-xL ist in PBMo sowohl mitochondrial als auch cytosolisch verteilt

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PBMC, die zuvor eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert wurden, freie Bakterien wurden danach entfernt. Dargestellt sind in (A) und (B) gleiche Bildausschnitte von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion. Zellkerne sind in blau, Bcl-xL in rot und Mito-Tracker in grün dargestellt. (C) und (D) zeigen jeweils einen PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion, wobei der Zellkern blau, Bcl-xL rot und das Bakterium grün dargestellt ist. Als mitochondriale Verteilungsmuster von Bcl-xL wurden klar abgrenzbare Co-Lokalisationen mit Mito-Tracker gedeutet, eine cytosolische Verteilung als diffuse Streuung über die ganze Zelle hinweg definiert.

Abbildung 8 zeigt Aufnahmen von CBMo. Sowohl (A) und (B) als auch (C) und (D) stellen gleiche Bildausschnitte dar. In (A) und (B) sind CBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion zu erkennen, bei denen eine Co-Lokalisation von Bcl-xL (rot) und Mito-Tracker (grün) deutlich wird. Wie in PBMo ist die Verteilung der Mito-Tracker-Markierung auch in CBMo distinkter als die Verteilung der Bcl-xL-Markierung, was darauf hindeutet, dass Bcl-xL sowohl cytosolisch als auch mitochondrial verteilt ist. In (C) und (D) sind CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion zu erkennen, wobei auffällt, dass die Bcl-xL-Markierung (rot) diffuser erscheint, als die Mito-Tracker-Markierung (grün). Bcl-xL scheint demnach auch in CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion vermehrt im Cytosol vorzuliegen.

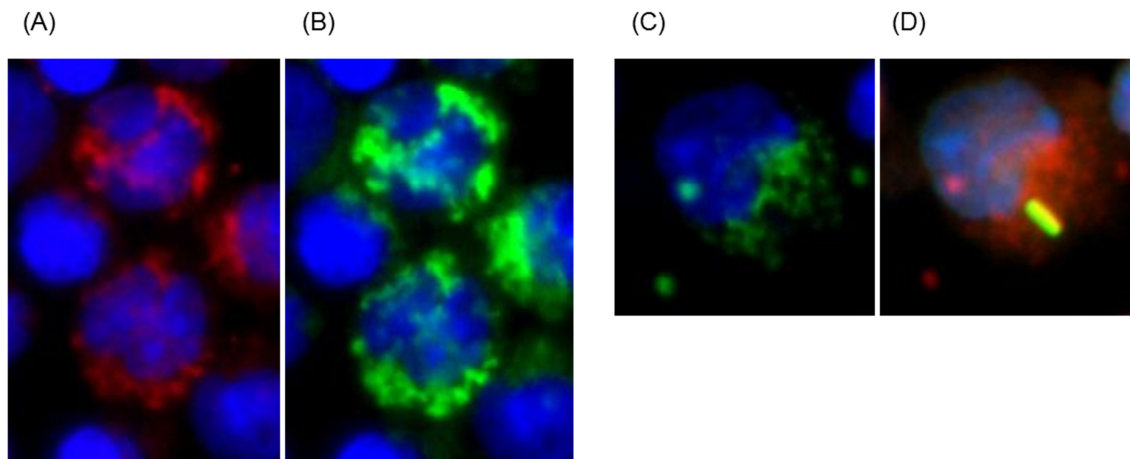


Abbildung 8: Bcl-xL ist in CBMo sowohl mitochondrial als auch cytosolisch verteilt

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CBMo, die zuvor eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert wurden, freie Bakterien wurden danach entfernt. (A) und (B) zeigen den gleichen Bildausschnitt mit unterschiedlichen Filtern ausgelesen, zu erkennen sind zwei CBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion, wobei Zellkerne blau, Bcl-xL rot und Mito-Tracker in grün dargestellt sind. (C) und (D) zeigen denselben CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion, wobei Zellkerne blau, Bcl-xL rot, Mito-Tracker grün und das Bakterium gelb dargestellt sind. Als mitochondriale Verteilungsmuster von Bcl-xL wurden klar abgrenzbare Co-Lokalisationen mit Mito-Tracker gedeutet, eine cytosolische Verteilung als diffuse Streuung über die ganze Zelle hinweg definiert.

4.2.2 Bcl-2-Expression in PBMo und CBMo

Es wurde ermittelt, wie viele Zellen Bcl-2 exprimieren. Dazu wurde der Anteil der Bcl-2-positiven Ereignisse an allen gemessenen Ereignissen bestimmt. Der Anteil an Bcl-2-positiven PBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion war nicht signifikant höher als der Anteil an CBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion (Abbildung 9, PBMo 1h p.i. 98±1% vs. CBMo 1h p.i. 96±2%, n=6, p>0,05). Es konnten weder Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten PBMo, noch zwischen infizierten und nicht-infizierten CBMo festgestellt werden (Abbildung 9).

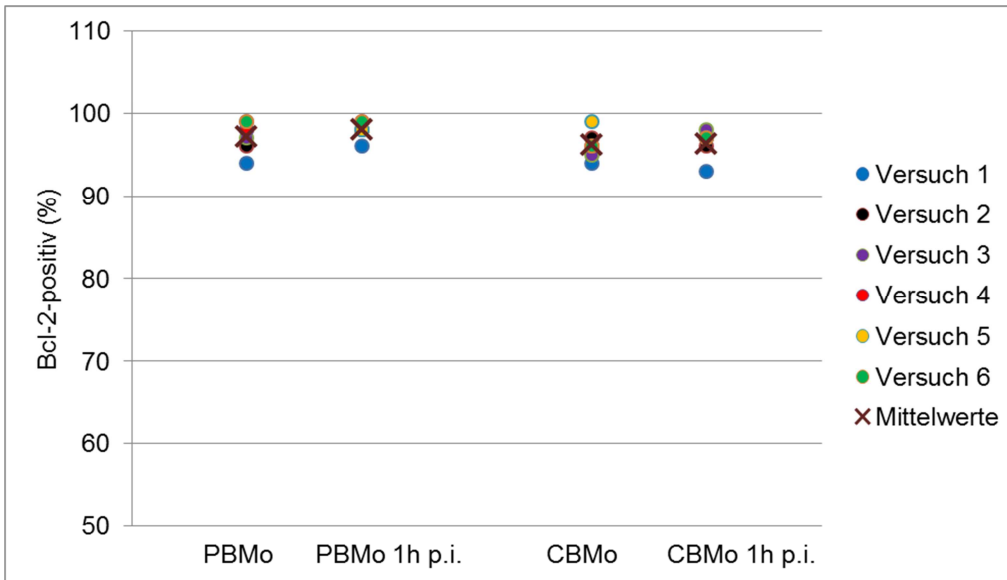


Abbildung 9: Nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} wird Bcl-2 von einem größeren Prozentsatz PBMo exprimiert als von CBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, danach freie Bakterien entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde der Anteil der Bcl-2-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6)

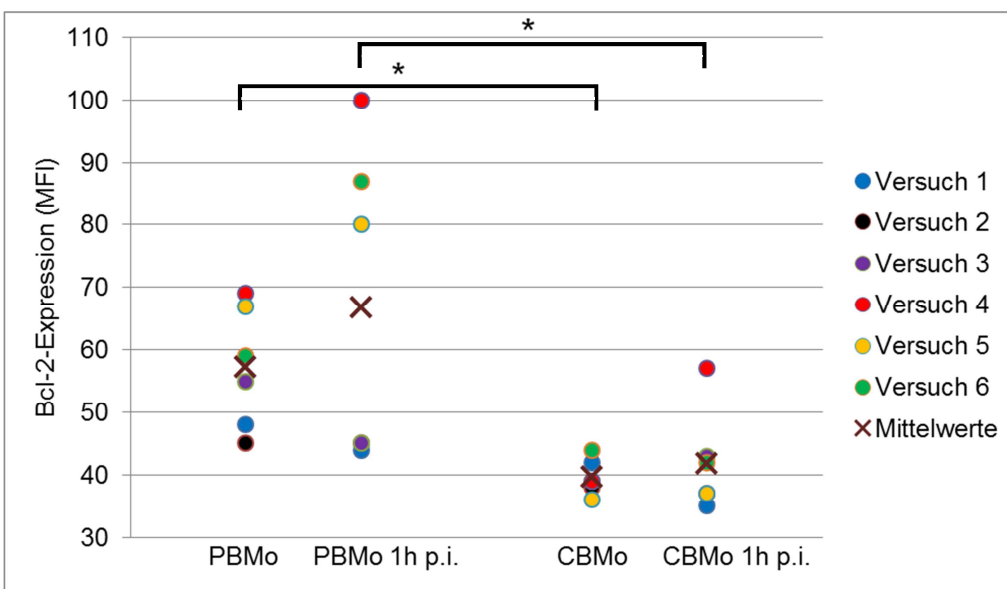


Abbildung 10: CBMo exprimieren weniger Bcl-2 als PBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, danach freie Bakterien entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde die MFI der Bcl-2-Markierung bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6, *p<0,05)

Die Analyse der MFI der Bcl-2-Markierung zeigt, dass PBMo mit und ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion signifikant mehr Bcl-2 als CBMo exprimierten (Abbildung 10, PBMo 57±9 vs. CBMo 40±3, n=6, p<0,05 und PBMo 1h p.i. 67±23 vs. CBMo 1h p.i. 42±7, n=6, p<0,05). Nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} stieg die MFI in PBMo und CBMo an, die Unterschiede erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau

4.2.3 Bax-Expression in PBMo und CBMo

Der Anteil der Bax-positiven PBMo war nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion signifikant höher als bei PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion (Abbildung 11, PBMo 90±3% vs. PBMo 1h p.i. 95±2%, n=6, p<0,05). In CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion war der Anteil der Bax-positiven Zellen ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 11, CBMo 83±8% vs. CBMo 1h p.i. 94±2%, n=6, p<0,05). PBMo und CBMo unterschieden sich im Anteil der Bax-positiven Zellen nicht.

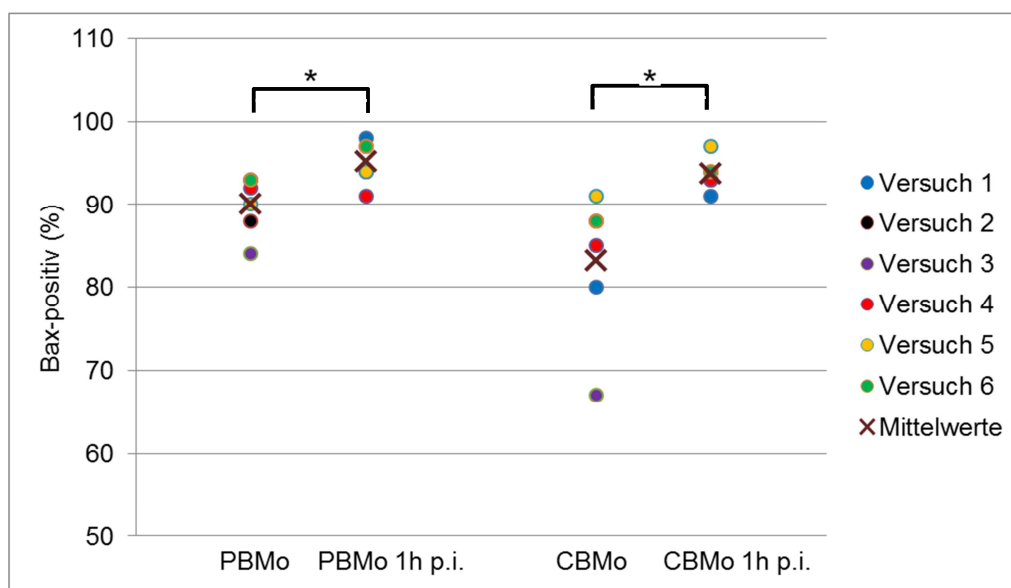


Abbildung 11: Bax wird nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} von einem größeren Prozentsatz PBMo und CBMo exprimiert

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, danach freie Bakterien entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde der Anteil der Bax-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6, *p<0,05)

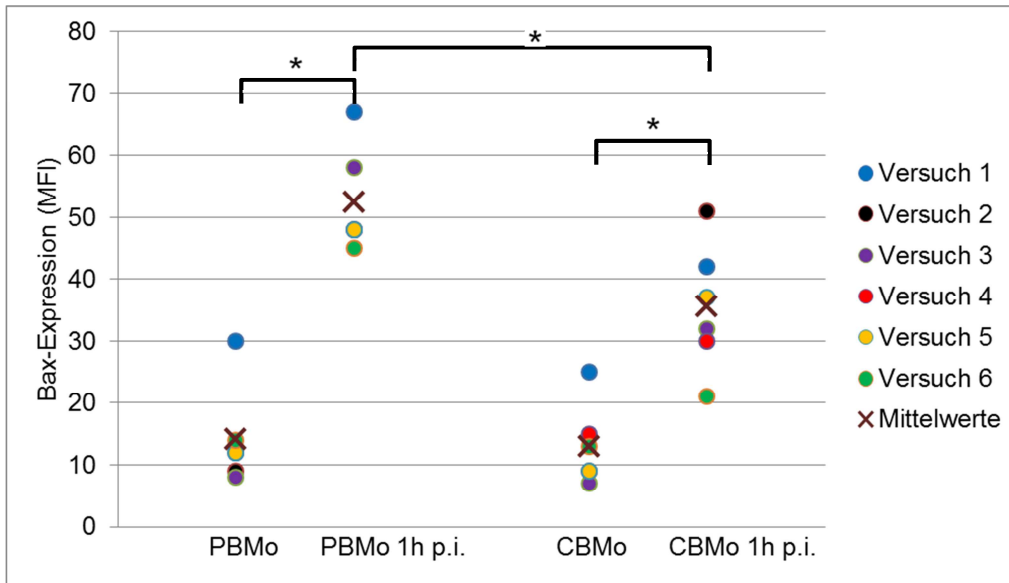


Abbildung 12: Die Expression von Bax ist in PBMo und CBMo nach Infektion mit *E. coli*^{GFP} gesteigert

PBMo und CBMo wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, danach freie Bakterien entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde die MFI der Bax-Markierung bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6, *p<0,05)

Zur Analyse der Bax-Expression wurde die MFI in PBMo und CBMo bestimmt. Sowohl PBMo als auch CBMo zeigten nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion eine signifikant höhere Expression von Bax (Abbildung 12, PBMo 14±7 vs. PBMo 1h p.i. 52±8, n=6, p<0,05 und CBMo 13±6 vs. CBMo 1h p.i. 36±9, n=6, p<0,05). Des Weiteren exprimierten CBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion signifikant weniger Bax als PBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion (Abbildung 12, PBMo 1h p.i. 52±8 vs. CBMo 1h p.i. 36±9, n=6, p<0,05).

Um zu ermitteln welchen Aktivitätszustand Bax besitzt, wurden Messungen mit dem Antikörper gegen das 6A7-Epitop im Bax-Molekül durchgeführt. Die Domäne 6A7 ist nur im aktivierten Bax-Molekül für den verwendeten Antikörper zugänglich (Hsu et al. 1997a, Peyerl et al. 2007). Abbildung 13 zeigt repräsentativ die Regulation des gesamten intrazellulären Bax-Gehalts im Vergleich zum aktivierten Bax.

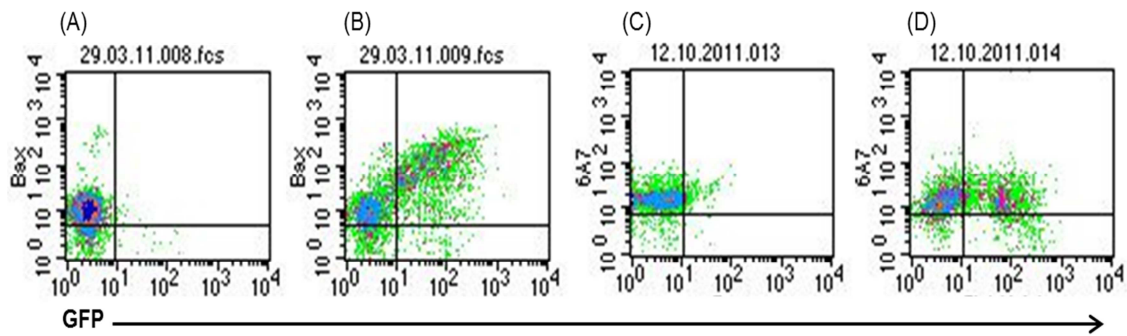


Abbildung 13: Bax wird nach *E. coli*^{GFP}-Infektion hochreguliert

Repräsentative Dot Plot Graphiken einer durchflusszytometrischen Messung der Bax- und Bax 6A7-Markierung. Abgebildet sind Zelldichteverteilungen von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion (A) und (C) und PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion (B) und (D), wobei auf der Abszisse die GFP-Markierung in logarithmischer Skalierung und auf der Ordinate die Bax-Markierung (A) und (B) und die Bax 6A7-Markierung (C) und (D) in logarithmischer Skalierung dargestellt sind.

Weder der Anteil an Bax 6A7-positiven Zellen (Abbildung 14), noch die MFI der Bax 6A7-Markierung (Abbildung 15) änderte sich signifikant nach *E. coli*^{GFP}-Infektion. (Abbildung 14, PBMo 91±4% vs. PBMo 1h p.i. 83±7%, n=3, p>0,05 und CBMo 90±4% vs. CBMo 1h p.i. 88±2%, n=3, p>0,05), (Abbildung 15, PBMo 12±4 vs. PBMo 1h p.i. 12±5%, n=3, p>0,05 und CBMo 13±5% vs. CBMo 1h p.i. 14±5%, n=3 p>0,05). Zwischen PBMo und CBMo konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

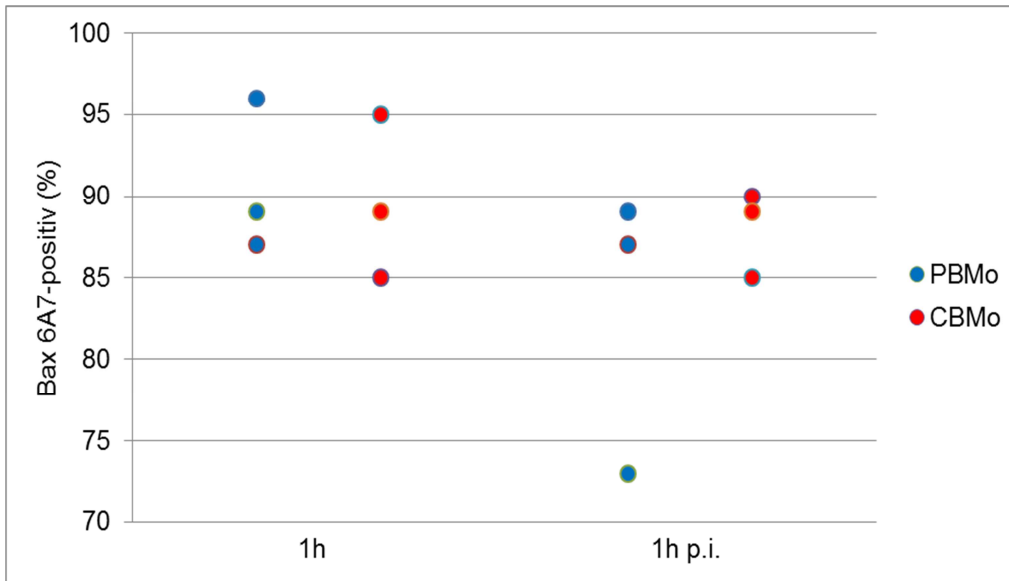


Abbildung 14: Der Anteil der Bax 6A7-positiven Ereignisse unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, freie Bakterien danach entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde der Anteil der 6A7-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt (n=3).

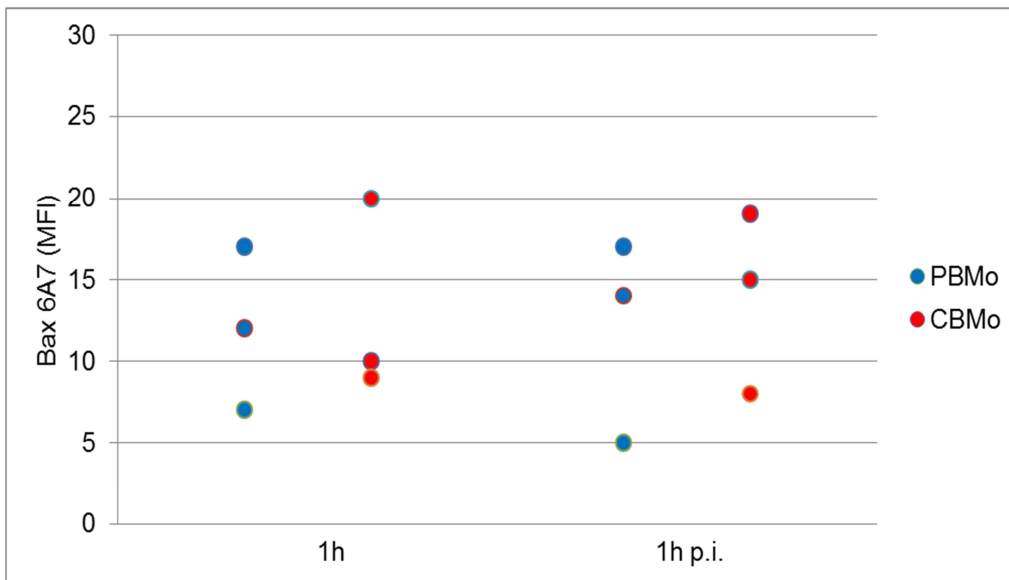


Abbildung 15: Die Expression des Bax-Fragmentes 6A7 unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, danach freie Bakterien entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde die MFI der Bax 6A7-Markierung bestimmt (n=3).

4.2.4 Bim-Expression in PBMo und CBMo

Es wurde der Anteil an Mo bestimmt, der Bim exprimiert. Es konnte weder in PBMo noch in CBMo eine signifikante Regulation nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion dargestellt werden (Abbildung 16, PBMo 90±4% vs. PBMo 1h p.i. 83±8%, n=5, p>0,05 und CBMo 87±7% vs. CBMo 1h p.i. 80±11%, n=6, p>0,05). Der Anteil der Bim-positiven Zellen unterschied sich nicht zwischen PBMo und CBMo.

Die MFI der Bim-Färbung in PBMo und CBMo änderte sich nicht signifikant nach *E. coli*^{GFP}-Infektion (Abbildung 17, PBMo 26±13 vs. PBMo 1h p.i. 17±7, n=5, p>0,05 und CBMo 16±4 vs. CBMo 1h p.i. 12±4, n=6, p>0,05). Zwischen PBMo und CBMo konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden.

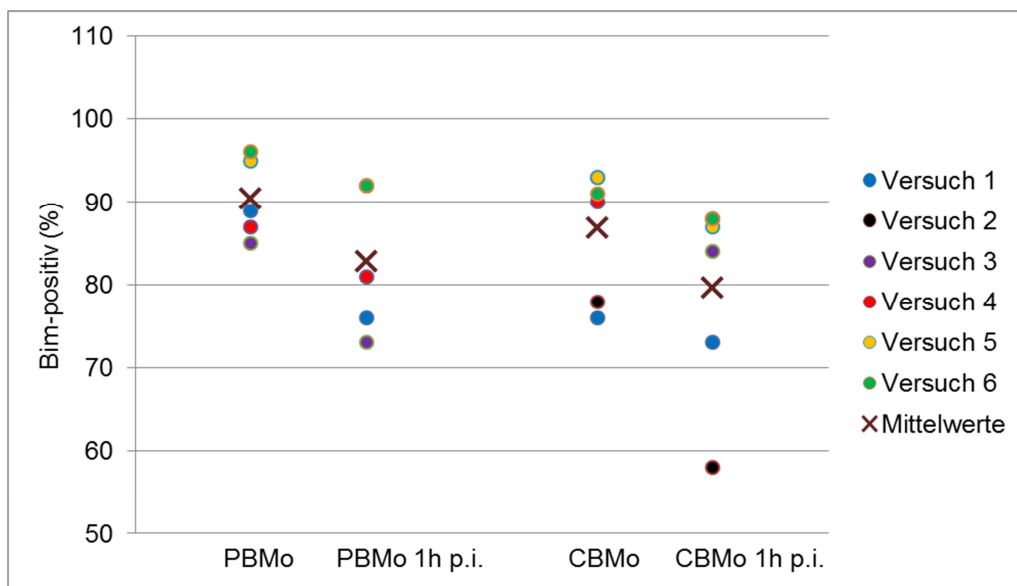


Abbildung 16: Der Anteil der Bim-positiven Ereignisse unterscheidet sich zwischen PBMo und CBMo nicht

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, freie Bakterien danach entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde der Anteil der Bim-positiven Ereignisse von allen Ereignissen bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6)

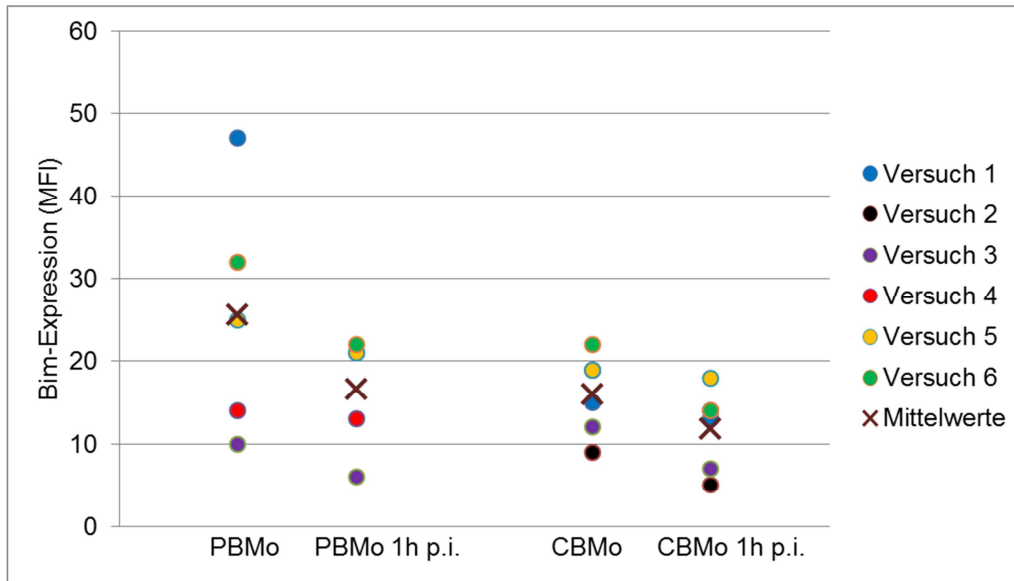


Abbildung 17: Die Expression von Bim unterscheidet sich nicht zwischen PBMo und CBMo

PBMC und CBMC wurden eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert, freie Bakterien danach entfernt. Mo wurden mittels Durchflusszytometrie durch Größe und Granularität und CD 14-Expression identifiziert. Anschließend wurde die MFI der Bim-Markierung bestimmt. Einzelwerte und Mittelwerte (n=6)

4.3 Bestimmung des Cytochrom c-Austritts aus Mitochondrien in PBMo und CBMo

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien gilt als sog. „Point of no-return“ im intrinsischen Signalweg der Apoptose und ist die unmittelbare Folge der Permeabilisierung der OMM durch Bax oder Bak (George et al. 2007, Peyerl et al. 2007). Daher sollte ermittelt werden, inwieweit sich die Regulation der Bcl-2-Proteine nach *E. coli*^{GFP}-Infektion auf den Austritt von intramitochondrialem Cytochrom c auswirkt. Als Basis für den Versuchsaufbau diente eine Publikation der Arbeitsgruppe um Stahnke et al. (2004), welche in ihrer Studie die Schlüsselmoleküle des intrinsischen Apoptoseweges in Leukämiezellen untersuchten.

Es wurden Präparate von nativen PBMo, PBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion, PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung, sowie von nativen CBMo und CBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion angefertigt und

fluoreszenzmikroskopisch miteinander verglichen. Als Positiv-Kontrolle wurden PBMo mit dem Apoptose-Induktor Mitomycin behandelt (Pirnia et al. 2002). Die Zellen wurden mit DAPI-Lösung behandelt, um Zellkerne anzufärben, mit Mito-Tracker Red CMXRos inkubiert, um das Verteilungsmuster von Mitochondrien sichtbar zu machen und mit dem Alexa-Fluor 647-markierten Antikörper gegen Cytochrom c markiert. Das intrazelluläre Verteilungsmuster von Cytochrom c wurde mit dem von Mitochondrien verglichen. Eine diffuse cytosolische Verteilung wurde als Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien gedeutet und eine distinkte Co-Lokalisation mit Mito-Tracker lies darauf schließen, dass kein Cytochrom c-Austritt stattgefunden hat.

Abbildung 18 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nativen PBMo, PBMo 1h p.i. und PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung. (A), (B) und (C) zeigen jeweils zwei gleiche Bildausschnitte von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion (A) und PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion ((B) und (C)), wobei unterschiedliche Filter zur Anwendung kamen. In (A) sind Zellkerne blau, Mito-Tracker rot und Cytochrom c grün dargestellt. Die Verteilung der Cytochrom c-Markierung deckte sich mit der von Mitochondrien, als Hinweis darauf, dass Cytochrom c nicht freigesetzt wurde. In (B) und (C) sind Zellkerne blau, Mito-Tracker rot, Cytochrom c gelb und Bakterien grün gefärbt. Das Verteilungsmuster von Cytochrom c war in (B) deutlich distinkter als in (C), was dafür spricht, dass in (C) Cytochrom c zumindest teilweise aus den Mitochondrien ausgetreten war. In (D) sind PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung gezeigt. Zellkerne sind blau und Cytochrom c gelbgrün dargestellt. Die Verteilung von Cytochrom c war diffuser als in (A)-(C), d.h. Cytochrom c wurde aus den Mitochondrien freigesetzt.

Um diese Beobachtung der verschiedenen Verteilungsmuster von Cytochrom c zu quantifizieren, wurden in 3 voneinander unabhängigen Versuchen Präparate von nativen PBMo, PBMo 1h p.i. PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung, nativen CBMo und CBMo 1h p.i. gefertigt und jeweils 100 Zellen auf ihre intrazelluläre Verteilung von Cytochrom c untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

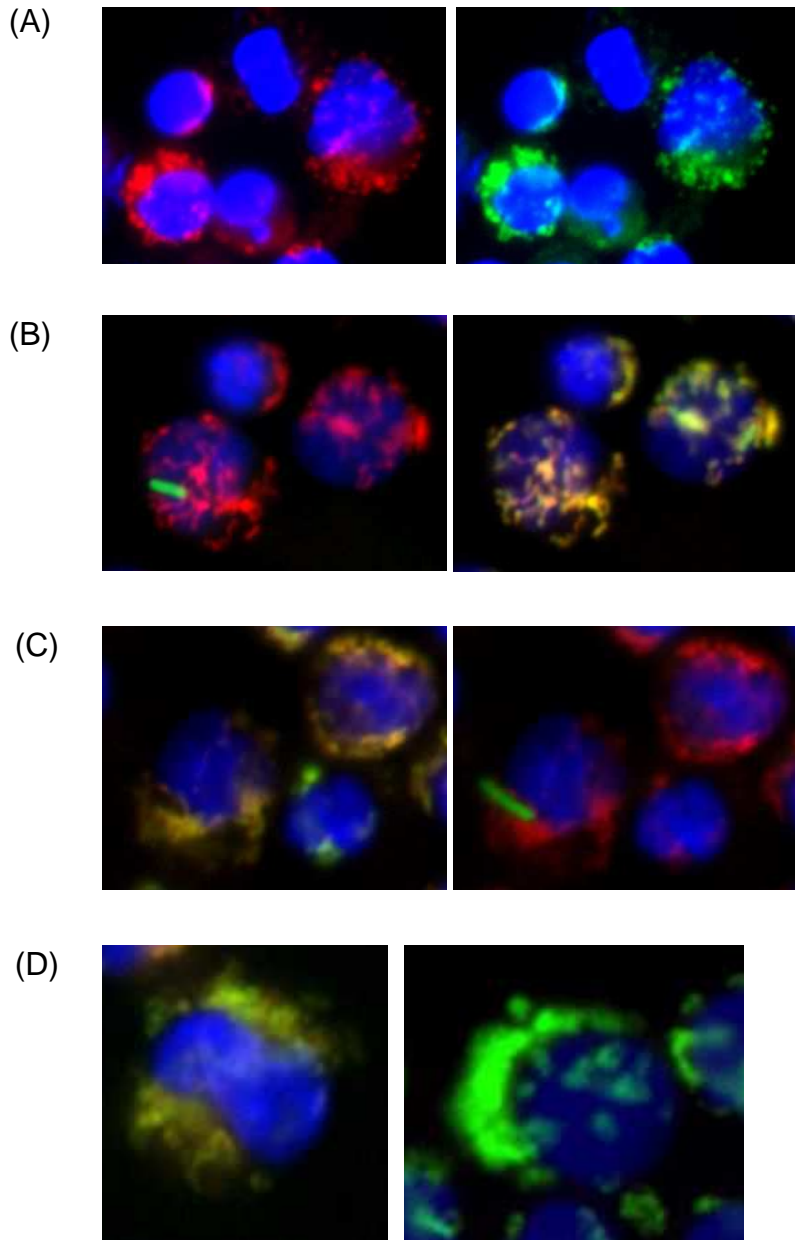


Abbildung 18: Das intrazelluläre Verteilungsmuster von Cytochrom c unterscheidet sich zwischen PBMo mit und ohne einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion und 24-stündiger Mitomycin-Behandlung

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PBMo, die entweder eine Stunde mit und ohne *E. coli*^{GFP} inkubiert wurden oder 24 Stunden mit Mitomycin behandelt wurden. In (A) sind zwei gleiche Bildausschnitte von PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion zu erkennen. Zellkerne sind blau, Cytochrom c grün und Mito-Tracker rot dargestellt. Sowohl (B) als auch (C) zeigen gleiche Bildausschnitte von PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion. Zellkerne sind blau, Cytochrom c gelb, Mito-Tracker rot und Bakterien grün dargestellt. (D) zeigt PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung, wobei Zellkerne blau und Cytochrom c gelbgrün dargestellt sind. Als mitochondriales Verteilungsmuster von Cytochrom c wurden klar abgrenzbare Co-Lokalisationen mit Mito-Tracker definiert, eine cytosolische Verteilung wurde als diffuse Streuung über die Zelle hinweg definiert.

Tabelle 2: PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung zeigen zu einem größeren Prozentsatz ein cytosolisches Verteilungsmuster von Cytochrom c als PBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion und PBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden in 3 voneinander unabhängigen Versuchen jeweils 100 PBMo und CBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion, PBMo und CBMo mit einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion und PBMo mit 24-stündiger Mitomycin-Behandlung gezählt. Das intrazelluläre Verteilungsmuster von Cytochrom c wurde in mitochondrial und cytosolisch unterteilt, wobei eine mitochondriale Verteilung als klar abgrenzbare Co-Lokalisation mit Mito-Tracker definiert wurde und eine cytosolische Verteilung als diffuse Streuung über die Zelle hinweg festgelegt wurde (siehe Abbildung 18). Angabe der Mittelwerte in %.

Verteilungsmuster	PBMo	PBMo 1h p.i.	PBMoMitomycin	CBMo	CBMo 1h p.i.
mitochondrial	89	75	42	90	83
cytosolisch	11	25	58	10	17

Die Zahlenwerte geben den Mittelwert als prozentualen Anteil von Zellen an, die ein mitochondriales Verteilungsmuster von Cytochrom c zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass sich native PBMo von nativen CBMo nur marginal in ihrer Cytochrom c-Verteilung unterscheiden (Tabelle 2, PBMo 11% vs CBMo 10%). PBMo 1h p.i. zeigten aber zu einem höheren Prozentsatz eine cytosolische Verteilung der Cytochrom c-Markierung als CBMo 1h p.i. (Tabelle 2, PBMo 1h p.i. 25 % vs. CBMo 1h p.i. 17%). Bei PBMo nach 24-stündiger Mitomycin-Behandlung wurde deutlich häufiger ein cytosolisches Verteilungsmuster von Cytochrom c festgestellt als bei PBMo 1h p.i. und CBMo 1h p.i. (Tabelle 2, PBMoMitomycin 58% vs. PBMo 1h p.i. 25% vs. CBMo 1h p.i. 17 %). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Mitomycin-Behandlung deutlich mehr Cytochrom c-Freisetzung stattfand als nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, ob der verminderte PICD von CBMo gegenüber PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion durch eine veränderte Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie zu erklären ist. Dazu wurde die mRNA- und Proteinexpression der Bcl-2-Proteinfamilie bestimmt, um Regulationsindices nach *E. coli*^{GFP}-Infektion zu vergleichen, sowie die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c als Effekt der Bcl-2-Protein-Regulation analysiert. Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf das Verhältnis von pro- zu anti-apoptischen Proteinen analysiert, um Aussagen über das apoptotische Gleichgewicht treffen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass (1) die mRNA-Expression von Bcl-xL in CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion gegenüber PBMo erhöht war, (2) die Proteinexpression von Bcl-xL in CBMo im Vergleich zu PBMo jedoch vermindert war, dass (3) Bax nach *E. coli*^{GFP}-Infektion hochreguliert wird, in PBMo stärker als in CBMo, dass (4) die Expression der 6A7-Domäne von Bax nicht reguliert wird und dass (5) Mitomycin-Behandlung zu einem größeren Prozentsatz zu einer Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien von Mo führt als *E. coli*^{GFP}-Infektion.

5.1 mRNA-Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich PBMo und CBMo in ihrer mRNA-Expression der Bcl-2-Proteine unterscheiden. Dazu wurden mittels Realtime-PCR relative Expressionswerte von Bcl-xL, Mcl-1, Bim, Bid und Bax in Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA des anti-apoptischen Proteins Bcl-xL in CBMo nach zweistündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion signifikant hochreguliert wurde, wohingegen bei PBMo keine Regulation stattfand (siehe Abbildung 2). Auch nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion war die mRNA-Expression von Bcl-xL in CBMo signifikant höher als in PBMo. Bei allen weiteren Proteinen konnten keine Unterschiede zwischen

PBMo und CBMo festgestellt werden (siehe Abbildung 2). Wie in Abbildung 3 illustriert ist, wird deutlich, dass in CBMo das Gleichgewicht von pro- zu anti-apoptotischer Protein-*de novo*-Synthese zugunsten eines Überlebens der Zellen reguliert wird, während in PBMo das Gleichgewicht in Richtung des Zelltodes verschoben ist.

Diese Beobachtung könnte einen Erklärungsansatz für den verminderten PICD von neonatalen Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion darstellen. Die Ursache für die unterschiedliche Genexpression von Bcl-xL in PBMo und CBMo ist nicht bekannt, jedoch beschrieben Okada et al. (1998), dass Bcl-xL vermutlich in sich differenzierenden Zellen der monozytären Zelllinie von Bedeutung ist. Daher kann die Vermutung angestellt werden, dass neonatale Mo sich vermehrt in Differenzierungsphasen befinden und weniger PICD auftritt.

In der Literatur finden sich einige Hinweise darauf, dass die Genexpression der Bcl-2-Proteinfamilie in Immunzellen durch Inflammationsstimuli induziert wird.

In neutrophilen Granulozyten wird Apoptose durch die induktive Genexpression von Mcl-1 reguliert (Dzhagalov et al. 2007, Moulding et al. 2001). In Lymphozyten scheint Bim als Modulator wichtig zu sein. Es wird unter Inflammationsbedingungen bei Sepsispatienten stark hochreguliert im Vergleich zu nicht-septischen Patienten und führt zu gesteigerter Apoptoserate (Weber et al. 2008). Auch die Genexpression von Bid und Bak war in Lymphozyten von Sepsispatienten im Vergleich zu nicht-septischen Patienten erhöht, wohingegen Bcl-2 und Bcl-xL herunterreguliert wurden (Weber et al. 2008). Weber et al. (2008) vermuten, dass eine Dysregulation der Bcl-2-Proteine in der Pathophysiologie der Sepsis eine wichtige Rolle spielt, wobei kein ursächlicher Mechanismus festgestellt werden konnte. Die Apoptose eosinophiler Granulozyten wird hingegen vor allem über den extrinsischen Weg reguliert, da die wichtigsten Bcl-2-Proteine dieses Zelltyps, Bax und Bcl-xL, permanent exprimiert werden (Dewson et al. 1999).

In der Zusammenschau zeigt sich, dass eine induktive Regulation der Bcl-2-Proteine in verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems stattfindet, wobei unter septischen, hyperinflammatorischen Bedingungen eine stärkere Regulation als unter nicht-septischen Bedingungen stattfindet, sodass

vermehrte Apoptose nachweisbar ist (Weber et al. 2008). In dem hier dargestellten *in vitro* Infektionsmodell scheinen CBMo eher als PBMo zu einer überschießenden Regulation vor allem von Bcl-xL zu neigen, was für den verminderten PICD von CBMo von entscheidender Bedeutung sein könnte.

5.2 Expression der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die mRNA-Regulation der Bcl-2-Proteine auf die tatsächliche Protein-Expression hat, wurde die Expression von Bcl-2, Bcl-xL, Bax und Bim durchflusszytometrisch analysiert.

5.2.1 Bcl-xL-Expression in PBMo und CBMo

Wie Abbildung 4 repräsentativ zeigt, sinkt die Bcl-xL-Expression in Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion. In Zusammenschau aller Versuche zeigt sich, dass sich diese Beobachtung auch statistisch ausdrückt (siehe Abbildung 5). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass CBMo signifikant weniger Bcl-xL exprimieren als PBMo (siehe Abbildung 6).

Die Datenlage zur Proteinexpression von Bcl-xL zeigt auf den ersten Blick ein konträres Bild im Vergleich zu den hier mittels Realtime-PCR gewonnenen mRNA-Daten von Bcl-xL (siehe Abbildung 3). Es konnten keine Auswirkungen der signifikanten Hochregulation von Bcl-xL-mRNA in CBMo nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion auf die Proteinexpression festgestellt werden. Da die Aktivität von Bcl-xL wesentlich von der Lokalisation in der Zelle abhängt, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des intrazellulären Verteilungsmusters von Bcl-xL angefertigt (siehe Abbildung 7 und 8), um Rückschlüsse auf die gemessene Proteinexpression ziehen zu können.

Bcl-xL ist sowohl im Cytosol verteilt als auch an die äußere mitochondriale Membran (OMM) gebunden (Hsu et al. 1997a, Hsu et al. 1997b, Jeong et al. 2004). Cytosolisches Bcl-xL liegt wahrscheinlich als Monomer (Petros et al.

2004) oder Homodimer vor, wobei der jeweilige C-Terminus eines Moleküls in der BH3-Bindungstasche des korrespondierenden Moleküls bindet (Jeong et al. 2004). Während eines Apoptosereizes wird Bcl-xL an die OMM transloziert, um in Interaktion mit Bax und weiteren Effektorproteinen zu treten (Billen et al. 2008, Jeong et al. 2004). Dabei scheint es entweder an die OMM gebundenes Bax unter Heterodimerbildung ins Cytosol zu re-translozieren (Edlich et al. 2011) oder unter Bindung von Bax-Aktivatoren deren stimulierende Funktion zu hemmen (Billen et al. 2008). Der verwendete Antikörper Bcl-xL H5 bindet gegen ein Epitop innerhalb der BH2-Domäne, welche für Heterodimerisierung und Oligomersierung von Bedeutung ist (Jeong et al. 2004, Sedlak et al. 1995, Yin et al. 1994). Es kann daher vermutet werden, dass der Antikörper nur monomeres und homodimeres Bcl-xL erfasst, nicht aber aktivierte Heterodimere bzw. -Polymere. Da Bcl-xL nach *E. coli*^{GFP}-Infektion als Apoptosereiz vermehrt produziert wird und in Interaktion mit Bax tritt, kann es vom Antikörper nicht mehr markiert werden, wodurch die registrierte MFI der Bcl-xL-Expression mit steigender Phagozytoseaktivität der Mo sinkt (siehe Abbildung 5 und 6).

Diese Schlussfolgerung deckt sich mit der Beobachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von PBMo und CBMo, dass das Verteilungsmuster von Bcl-xL nach *E. coli*^{GFP}-Infektion eher cytosolisch erscheint, während es bei Mo ohne Infektion sowohl cytosolisch als auch mitochondrial verteilt ist (siehe Abbildungen 7 und 8). Dies lässt schließen, dass nach *E. coli*^{GFP}-Infektion Bcl-xL vermehrt aktiviert wird und somit nicht mehr durch den Antikörper markiert werden kann.

Aus diesen Schlussfolgerungen kann eine Erklärung für den scheinbaren Widerspruch abgeleitet werden, dass CBMo mehr Bcl-xL-mRNA exprimieren als PBMo, die Proteinexpression in CBMo jedoch niedriger ist als in PBMo. Unter der Annahme, dass der verminderte PICD in CBMo gegenüber PBMo unter anderem durch eine divergente Regulation der Bcl-2-Proteine verursacht ist, kann postuliert werden, dass Bcl-xL in CBMo 1h p.i. mutmaßlich stärker aktiviert ist als in PBMo 1h p.i., um Apoptose zu verhindern. Da nur unaktivierte Monomere bzw. Homodimere angefärbt werden können, deutet die verminderte

Expression von Bcl-xL in CBMo gegenüber PBMo daraufhin, dass mehr aktivierte Proteine vorliegen könnten. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die Anzahl an Heterodimeren bzw. Polymeren keine direkten Rückschlüsse auf das apoptotische Gleichgewicht zulassen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Bax-Expression kann jedoch ein Einfluss der divergenten Bcl-xL-Regulation für den verminderten PICD von CBMo gegenüber PBMo postuliert werden.

In dem gewählten Versuchsaufbau konnte die Proteinexpression von Bcl-xL nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion analysiert werden. Die Auswirkung der mRNA-Regulation nach zweistündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion auf die Proteinexpression konnte jedoch nicht erfasst werden, daher sind nachfolgende Versuche nötig, um eventuelle Regulationen zu einem späteren Zeitpunkt zu detektieren, wobei beachtet werden sollte, dass auch aktiviertes Bcl-xL erfasst werden kann.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Bcl-xL in Mo oder M ϕ durch einen Apoptosereiz hochreguliert wird (Okada et al. 1998, Sukumaran et al. 2004). Die Regulation scheint vom Differenzierungsgrad der Zellen abzuhängen (Okada et al. 1998). Lotem et al. (1995) konnten an myeloiden leukämischen Zellen zeigen, dass Bcl-xL, aber nicht Bax und Bcl-2 hochreguliert wurden, wenn diese mit Dexamethason und/oder Interleukin 6 zur Differenzierung bewegt wurden. Durch die gesteigerte Bcl-xL-Expression konnte Apoptose, induziert durch Cycloheximid oder Adriamycin, verhindert werden. Ohta et al. (1995) konnten an T-Lymphozyten ebenfalls die Bedeutung von Bcl-xL bei Differenzierungsvorgängen zeigen, wobei die genaue Funktion nicht erklärt werden konnte.

Der Differenzierungsgrad von CBMo und PBMo wurde in den hier gezeigten Versuchen nicht bestimmt. Zusammengefasst lässt sich jedoch festhalten, dass möglicherweise ein unterschiedlicher Differenzierungsgrad die verschiedenen Apoptoseverhalten von PBMo und CBMo beeinflusst. Dieser Ansatz könnte durch nachfolgende Experimente überprüft werden.

5.2.2 Bcl-2-Expression in PBMo und CBMo

Abbildung 10 zeigt, dass CBMo signifikant weniger Bcl-2 exprimieren als PBMo. Nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion konnte keine Regulation der Proteinexpression festgestellt werden. Bcl-2 wird in die Gruppe der anti-apoptischen Proteine eingegliedert, die Beobachtung, dass PBMo mehr Bcl-2 exprimieren als CBMo erscheint jedoch kontrovers im Hinblick auf die Hypothese, dass der verminderte PICD von CBMo über die Bcl-2-Proteine vermittelt ist. In der Literatur finden sich jedoch mehrere Hinweise, dass Bcl-2 nicht das dominante anti-apoptische Protein in Mo ist, sondern Bcl-xL (Ohta et al. 1995, Okada et al. 1998, Sanz et al. 1997, Sukumaran et al. 2004). Es ist daher fraglich, inwieweit Bcl-2 das apoptotische Gleichgewicht in Mo und Makrophagen beeinflusst. Es lässt sich auch keine Aussage über die Aktivität des Proteins treffen, da der verwendete Antikörper die Gesamtheit von Bcl-2 erfasst und nicht zwischen aktiven und inaktiven Formen differenziert.

5.2.3 Bax-Expression in PBMo und CBMo

Bax wurde nach einstündiger *E. coli*^{GFP}-Infektion sowohl in PBMo als auch in CBMo hochreguliert, wobei PBMo 1h p.i. signifikant mehr Bax exprimierten als CBMo 1h p.i. (siehe Abbildung 11 und 12). Da Bax als pro-apoptisches Effektormolekül durch Oligomerisierung in der OMM (Peyerl et al. 2007) zu einer Cytochrom c-Freisetzung führen kann (Dejean et al. 2005), welche die Caspasenaktivität triggert (Jiang et al. 2000, Zou et al. 1999), kann anhand der Ergebnisse ein Einfluss von Bax auf den verminderten PICD von CBMo postuliert werden.

Bax liegt im inaktiven Zustand vorwiegend als Monomer im Cytosol vor (Hsu et al. 1997b, Peyerl et al. 2007). Wird es durch einen Apoptosereiz aktiviert, wirkt es als Oligomer destabilisierend auf das mitochondriale Membranpotential (Peyerl et al. 2007), indem es Poren in der OMM formt, durch die intramitochondriale Moleküle ins Cytosol austreten können (Dejean et al. 2005).

Eine Oligomerisierung scheint nur möglich durch eine Konformationsänderung in der Nähe des N-Terminus, bei der die 6A7-Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 13-19, exprimiert wird (Hsu et al. 1997a, Peyerl et al. 2007). Nach erfolgter Konformationsänderung kann eine Interaktion zwischen BH3-Domäne und hydrophober Furche jeweils zweier Moleküle zur Formung von Bax-Homodimeren führen (Bleicken et al. 2010, Dewson et al. 2012), welche über die α 5- und α 6-Helices in die OMM inseriert werden (Annis et al. 2005) und mit weiteren Homodimeren oligomerisieren können (Westphal et al. 2011). Als Erkennungssequenz für aktiviertes Bax haben Hsu et al. (1997a) die 6A7-Domäne definiert, welche durch den Bax 6A7-Antikörper ab5714 gebunden wird. Um zu analysieren, ob die vermehrte Bax-Expression nach *E. coli*^{GFP}-Infektion auf aktiven Formen des Proteins beruht, wurden PBMo und CBMo mit dem Bax 6A7-Antikörper behandelt.

Wie in Abbildung 14 und 15 illustriert ist, konnten weder Unterschiede mit oder ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion noch zwischen PBMo und CBMo konstatiert werden. Hsu et al. (1997a) vermuteten 1997 jedoch schon, dass eine Dimerisierung, bzw. Polymerisierung von Bax mit Bcl-xL verhindert, dass der Bax 6A7-Antikörper das Epitop binden kann. Edlich et al. (2011) konkretisierten diesen Verdacht und beschreiben eine sterische Blockade der 6A7-Domäne durch Bcl-xL. Da in dem gewählten Versuchsaufbau die *in vivo* vorkommenden Interaktionen zwischen den Bcl-2-Proteinen nicht gestört werden, ist es wahrscheinlich, dass der Bax 6A7-Antikörper das Epitop aufgrund der Bcl-xL-Aktivität nicht binden kann. Folglich kann aus den Experimenten mit dem Bax 6A7-Antikörper nicht auf das apoptotische Gleichgewicht geschlossen werden. Die Ergebnisse der Messung der gesamten Bax-Expression lassen jedoch in der Zusammenschau mit den Ergebnissen der Bcl-xL-Expression die Vermutung zu, dass CBMo im Vergleich zu PBMo eher anti-apoptotisch reguliert sind, da sie weniger pro-apoptotisches Bax und mehr anti-apoptotisches Bcl-xL exprimieren.

5.2.4 Bim-Expression in PBMo und CBMo

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Bim zwischen PBMo und CBMo festgestellt werden. Des Weiteren unterschied sich die Expression zwischen Mo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion nicht signifikant von Mo mit *E. coli*^{GFP}-Infektion (siehe Abbildung 16 und 17). Wie Abbildung 2 zeigt, wurde die mRNA von Bim nach zweistündiger Infektion mit *E. coli*^{GFP} vermehrt exprimiert im Vergleich zur Kontrolle ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion. Diese Regulation lässt sich in dem gewählten Versuchsaufbau zur Analyse der Proteinexpression nach einstündiger Infektion nicht nachweisen, die Auswirkung könnte sich erst zu einem späteren Zeitpunkt zeigen, weshalb nachfolgende Versuche unter diesem Ansatzpunkt durchgeführt werden sollten. Weitere Erklärungen für die Abweichung der Proteinexpression von der mRNA-Expression könnten transkriptionale und posttranslationale Modifikationen von Bim sein. Modifikationen der Transkription des Bim-Gens sind mehrfach in der Literatur beschrieben (Dijkers et al. 2000, Putcha et al. 2001, Puthalakath et al. 2002, Shinjyo et al. 2001, Whitfield et al. 2001), jedoch an verschiedenen Zelltypen, sodass keine eindeutigen Rückschlüsse auf die in Abbildung 16 und 17 dargestellten Ergebnisse möglich sind. Auch translationale und posttranslationale Regulationen sind beschrieben. So kann die Translation der Bim-mRNA durch miRNA-Cluster gehemmt werden (Xiao et al. 2008) oder Bim durch Phosphorylierung in seiner Aktivität modifiziert werden (Ewings et al. 2007a). Weitere Nachforschungen, ob derartige Variationen von Bim für den PICD in PBMo und CBMo eine Rolle spielen, sind notwendig.

Kirschnek et al. (2005) konnten zeigen, dass der PICD von Makrophagen Bim-abhängig ist und Bim dabei der Hauptregulator zu sein scheint. Es existieren derzeit zwei Theorien über die Bim-Aktivität. Willis et al. (2007) vermuteten, dass Bim das Effektormolekül Bax aus einer Bindung mit Bcl-xL verdrängen kann und somit Bax aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass Bax *in vivo* als Monomer vorliegt (Hsu et al. 1997b) und nach erfolgtem Apoptosereiz könnte Bcl-xL je nach Gleichgewichtslage mit Bax dimerisieren, um Apoptose zu verhindern. Als Modulator könnte Bim Bax aus dieser Bindung lösen, um

dessen permeabilisierende Wirkung auf die OMM zu induzieren (Chen et al. 2005, Ewings et al. 2007a, Ewings et al. 2007b, Willis et al. 2005). Auch für Bid, ein weiteres BH3-only-Protein, ist dieser Mechanismus beschrieben (Chipuk et al. 2008a).

Ein zweites Modell beschreibt Bim als direkten Aktivator von Bax, wenn es der Hemmung durch anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Mcl-1 oder Bcl-xL entgeht (Kuwana et al. 2005, Letai et al. 2002). Es konnten drei Isoformen von Bim identifiziert werden, die durch alternatives Splicing entstehen können, Bim_S, Bim_L und Bim_{EL} (Ewings et al. 2007b, Puthalakath et al. 1999), von denen nur Bim_S direkt an Bax zu binden scheint (Marani et al. 2002). Die beiden anderen Isoformen scheinen nur an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine binden zu können (Gomez-Bougie et al. 2005). Da beide Theorien bisher weder sicher widerlegt werden konnten noch bestätigt wurden, kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, inwiefern Bim in die oben beschriebene Interaktion zwischen Bcl-xL und Bax eingreifen kann.

Kirschnek et al. (2005) und Steimer et al. (2009) konnten jedoch die Bedeutung von Bim für den PICD von Mo und Mφ belegen. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Bim am Cytoskelett und dessen entscheidender Funktion im Phagozytose-Mechanismus angenommen.

Weitere Hinweise für die Bedeutung von Bim in der Regulation der Apoptose von Immunzellen liefern Bouillet et al. (1999), die Bim als primären Regulator der hämatopoietischen Homöostase definieren. Hildemann et al. (2002) konnten zeigen, dass auch T-Lymphozyten in Bim-abhängiger Weise apoptotisch zugrunde gehen.

5.3 Bestimmung des Cytochrom c-Austritts aus Mitochondrien in PBMo und CBMo

Es wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt, inwieweit sich die Regulation der Bcl-2-Proteine auf den Austritt von intramitochondrialem Cytochrom c ins Cytosol auswirkt (siehe Abbildung 18). Es konnte festgestellt werden, dass sich die basale Cytochrom c Freisetzung von PBMo und CBMo ohne *E. coli*^{GFP}-Infektion nicht unterscheidet, PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion jedoch zu einem größeren Prozentsatz Cytochrom c freisetzen als CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion (siehe Tabelle 2). Des Weiteren löste Mitomycin-Behandlung zu einem deutlich höheren Prozentsatz den Austritt von Cytochrom c aus als *E. coli*^{GFP}-Infektion. Daraus wird ersichtlich, dass Mitomycin-Behandlung zu einer stärkeren Stimulation des intrinsischen Apoptoseweges bei Mo führt als *E. coli*^{GFP}-Infektion. Der Unterschied in der Cytochrom c Freisetzung zwischen PBMo und CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion untermauert die Hypothese, dass der verminderte PICD von CBMo durch eine Alteration des intrinsischen Apoptoseweges begründet ist und stellt die Auswirkungen der divergenten Regulation der Bcl-2-Proteine dar. Allerdings muss angenommen werden, dass auch der extrinsische Signalweg eine Rolle spielt, da der beobachtete Unterschied den verminderten PICD nicht vollständig erklären kann (Gille und Dreschers et al. 2013, Dreschers und Gille et al. 2013, Gille et al. 2008).

Es wurden zwei Möglichkeiten der Cytochrom c Freisetzung publiziert. Entweder wird die Signalkaskade über Bcl-2-Proteine gesteuert oder ein intramitochondrialer Calcium-Überschuss führt zur Matrixschwellung und Ruptur der inneren mitochondrialen Membran (IMM), sodass Cytochrom c ins Cytosol austreten kann (Ott et al. 2002). Cytochrom c ist ein physiologischer Bestandteil der Atmungskette und im Intermembranraum (IMS) über Cardiolipin an der IMM gebunden. Dabei existieren zwei Bindungskonformationen, eine schwache Bindung über elektrostatische Wechselwirkungen (Nicholls 1974) und eine stärkere Bindung, bei der hydrophobe Wechselwirkungen die Tertiärstruktur verändern, sodass Teile des Proteinkomplexes in der IMM verankert sind (Cortese et al. 1998, Gorbenko 1999). Daraus folgerten Ott et al. (2002), dass

die Freisetzung von Cytochrom c in zwei Schritten erfolgen muss und konnten nachweisen, dass sowohl eine Ablösung von der IMM und Cardiolipin, als auch eine Permeabilisierung der OMM stattfinden muss. Als Hauptmechanismus für die Ablösung von der Membran konnte die Oxidation von Cardiolipin durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert werden (Ott et al. 2002, Ott et al. 2007, Piccotti et al. 2004). In weiteren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Cardiolipin eine direkte Beteiligung an den Poren-formenden Einheiten der Bcl-2-Proteine hat (Kuwana et al. 2002, Tyurin et al. 2006), sodass Funktionsunterschiede von Cardiolipin zwischen PBMo und CBMo in der Freisetzung von Cytochrom c eine Rolle spielen könnten. Dieser Ansatz konnte im dargestellten Versuchsaufbau nicht überprüft werden und sollte Gegenstand nachfolgender Forschung sein.

Die Regulation der Calcium-Homöostase stellt einen weiteren Faktor dar, welcher den differierenden PICD von PBMo und CBMo mitbedingen könnte. Die Bcl-2-Proteine steuern auch den intrazellulären Calciumgehalt im Endoplasmatischen Reticulum (Annis et al. 2004, Distelhorst et al. 2004, Kim et al. 2006, Walter et al. 2005). Die dargestellte Regulation der Bcl-2-Proteine könnte sich auch auf das Endoplasmatische Reticulum auswirken, sodass sich die cytoplasmatische Calcium-Konzentration ändert und damit das zelluläre Ionenverhältnis. Über den o.g. Weg der Matrixschwellung und Ruptur der IMM könnten so intramitochondriale Faktoren austreten und zu einer Potenzierung der Effekte der Bcl-2-Proteine am Mitochondrium führen. Weitergehend ist bekannt, dass neben Cytochrom c noch weitere freigesetzte Faktoren zum Zelltod führen können, wie z.B. Smac/DIABLO oder apoptosis-inducing factor (AIF) (Kroemer et al. 2007, Susin et al. 1999). Der Einfluss dieser Faktoren auf den PICD von Mo sollte ebenfalls analysiert werden.

5.4 Bedeutung des intrinsischen Apoptoseweges für den PICD von Mo

Um die Bedeutung des intrinsischen Apoptoseweges für den PICD von Mo genauer eruieren zu können, müssen die dargestellten Ergebnisse im Zusammenhang mit zwei anderen Studien der eigenen Arbeitsgruppe interpretiert werden. Beide Arbeiten thematisieren den extrinsischen Apoptoseweg bei Mo im Hinblick auf den verminderten PICD von CBMo gegenüber PBMo. Zum einen wurde das CD95-System analysiert, zum anderen die Bedeutung von TNF- α untersucht.

Gille und Dreschers et al. (2013) konnten an mit *E. coli*^{GFP}-infizierten PBMo und CBMo die Relevanz des CD95-Systems nachweisen. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion weniger sCD95L sezernierten als PBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion. Diese verminderte Sekretion des Todesliganden könnte eine Ursache für den verminderten PICD von CBMo darstellen und somit zu einer ineffizienten Regulierung von Immuneffektorzellen und verlängerter Inflammationsdauer führen, wie sie in mehreren Studien beschrieben ist (Giamarellos-Bourboulis et al. 2006, Hotchkiss et al. 2009, Hotchkiss et al. 2006, Pinheiro da Silva et al. 2009, Schultz et al. 2004). In Vorarbeit dazu konnte gezeigt werden, dass sich PBMo und CBMo zwar nicht in ihrer Expression des CD95-Rezeptors unterscheiden, CBMo jedoch signifikant weniger CD95L-mRNA synthetisieren als PBMo (Gille et al. 2008).

Zur Abgrenzung muss aber zwischen PICD und sog. Bystander-Apoptose von nicht phagozytierenden Mo unterschieden werden. Dazu konnten Dreschers und Gille et al. (2013) nachweisen, dass eine erhebliche Zahl der Mo durch Bystander-Zelltod sterben und der PICD und die Apoptose von Bystander-Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion TNF- α vermittelt und in CBMo vermindert ist. Es konnte sowohl eine verringerte TNF- α -Produktion als auch eine reduzierte TNF-Rezeptor-Expression in CBMo gegenüber PBMo eruiert werden. Somit kann festgehalten werden, dass lösliche Faktoren, wie der Todesligand CD95L oder TNF- α den Zelltod von Mo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion mitbedingen. Dieser Nachweis konnte auch an Mo oder M ϕ nach Infektion mit anderen Erregern erbracht werden, wie z.B. *Chlamydia trachomatis* (Jendro et al. 2000),

Streptococcus pneumoniae (Dockrell et al. 2001) oder *Mycobacterium tuberculosis* (Oddo et al. 1998).

Darüber hinaus wiesen Dreschers und Gille et al. (2013) nach, dass eine Hemmung der Aktin-Polymerisation zu verminderter Phagozytose und verminderter TNF- α -Sekretion führte. Für das Aktin-Filament des Zytoskeletts konnte eine regulierende Funktion in der Apoptose-Induktion durch TNF- α herausgestellt werden (Chen et al. 2011). Dennoch war eine erhebliche Rest-Apoptoserate messbar (Dreschers und Gille et al. 2013), sodass außer löslichen Apoptose-auslösenden Faktoren weitere Ursachen ausschlaggebend sein müssen.

Es kann nun aufgrund der oben dargestellten Umstände die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sowohl der extrinsische Apoptoseweg als auch der intrinsische Weg für den PICD von Bedeutung sein müssen. Dabei scheint in phagozytierenden Zellen vor allem die Bcl-2-Protein-vermittelte Apoptose ausschlaggebend zu sein, wohingegen Bystander-Mo hauptsächlich über sezernierte Todesliganden sterben. Es kann gemutmaßt werden, dass phagozytierende Zellen, die sich in einem Gleichgewicht zwischen Apoptose-auslösenden Einflüssen und aktivierenden Einflüssen befinden, zum Teil durch PICD sterben. Dabei werden Bystander-Mo, die weniger direkte und damit aktivierende Einflüsse durch die Phagozytose von Pathogenen erfahren, über sezernierte Todesliganden wie CD95L und TNF- α in die Apoptose getrieben. Durch diese Regulation sollen sowohl bakterielle Pathogene schnell eliminiert werden, als auch übermäßige Inflammation verhindert werden.

Im Hinblick auf den verminderten PICD von CBMo gegenüber PBMo kann nun auf folgende Ursachen geschlossen werden:

Durch eine unterschiedliche Expression und Regulation der Bcl-2-Proteine in PBMo und CBMo scheinen CBMo weniger Cytochrom c aus den Mitochondrien freizusetzen, was zu verminderter Apoptoserate führt. Über sezernierte Faktoren der apoptotischen Zellen werden Bystander-Mo zum Zelltod getrieben, wobei CBMo weniger Todesliganden sezernieren als PBMo und zum Teil eine geringere Rezeptorexpression zeigen (Dreschers und Gille et al. 2013, Gille und Dreschers et al. 2013). So verstärken sich intrinsische und extrinsische

Apoptose-Induktion gegenseitig und führen zu einer geringeren PICD-Rate in CBMo.

5.5 Diskussion der Methoden

Bei der Auswahl der erwachsenen Blutspender wurde darauf geachtet, dass es sich um ein möglichst homogenes Kollektiv handelt. Spender mit einer akuten oder chronischen Erkrankung wurden nicht ins Kollektiv mit einbezogen. Eine serologische Kontrolle zum Ausschluss einer subklinischen Infektion erfolgte nicht. Es wurde nur das Nabelschnurblut von reif geborenen Kindern in die Studie einbezogen. Neugeborene mit Infektionszeichen wie z.B. grünem Fruchtwasser wurden nicht untersucht. Ebenso wurde darauf geachtet, dass Neugeborene, deren Mütter erhöhte Entzündungsparameter aufwiesen, nicht mit eingeschlossen wurden. Der weitere klinische Verlauf nach der Geburt wurde nicht berücksichtigt.

In den vorgestellten Versuchen wurde die Gesamtheit der isolierten Mo auf ihre Expression der Bcl-2-Proteine untersucht. Es konnte allerdings keine Unterscheidung getroffen werden, welchen Differenzierungsgrad die Zellen aufweisen. Wie Okada et al. (1998) und Lotem et al. (1995) zeigen konnten, scheint die Regulation der Proteine vom Differenzierungsgrad abzuhängen. Nachfolgende Experimente könnten die Fragestellung klären, inwieweit sich der Differenzierungsgrad von Mo auf den PICD nach *E. coli*^{GFP}-Infektion auswirkt.

Im dargestellten Infektionsmodell wurde mit einer MOI von 1:50 infiziert, um ausreichend hohe Phagozytoseraten zu gewährleisten. Es konnte jedoch nicht zwischen tatsächlicher Phagozytose und Anlagerung von Bakterien an die Zellmembran unterschieden werden, sodass die Ergebnisse als Zusammenspiel aus beiden Möglichkeiten zu sehen sind. Die Bedeutung der Phagozytose für den intrinsischen Apoptoseweg konnte jedoch indirekt durch Dreschers und Gille et al. (2013) herausgestellt werden.

Die Expression der Bcl-2-Proteine wurde quantitativ durch FACS-Analyse bestimmt und die mRNA-Expression durch Realtime-PCR ermittelt. Eine direkte

Aussage über die Funktionalität der Proteine ist mit diesen Methoden allerdings nicht möglich, sodass mit Hilfe von bestehenden Literaturhinweisen Schlüsse gezogen werden konnten. Knock-out-Modelle könnten zur genauen Klärung der Funktion in Mo herangezogen werden. Indirekte Aussagen zur Funktionalität konnten jedoch getroffen werden. Die Messung der Proteine erfolgte durch Markierung mit monoklonalen Antikörpern. Durch Aktivierung konnte teilweise der Antikörper nicht an das jeweilige Epitop binden, wodurch quantitativ Fehlmessungen stattfanden. Es konnten dadurch jedoch Aussagen über den Aktivierungsgrad getroffen werden und Rückschlüsse über das Verhältnis zwischen PBMo und CBMo gezogen werden.

6 Zusammenfassung

Der Phagozytose-induzierte Zelltod (phagocytosis induced cell death, PICD) von Monozyten ist von entscheidender Bedeutung für die Beendigung einer Immunreaktion. Dysregulationen des PICD konnten als mögliche Ursache für eine überschießende Inflammationsreaktion auf bakterielle Pathogene in der Neonatalzeit identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Apoptose-regulierenden Bcl-2-Proteine auf den verminderten PICD von neonatalen Monozyten (Monozyten aus Nabelschnurblut reifer Neugeborener, cord blood monocytes, CBMo) untersucht werden. Dazu wurden in einem *in vitro* Infektionsmodell mit *E. coli*^{GFP} Monozyten von erwachsenen Spendern (peripheral blood monocytes, PBMo) und CBMo untersucht.

Mittels Realtime-PCR wurde die mRNA-Expression der anti-apoptotisch wirkenden Proteine Bcl-xL und Mcl-1 sowie der pro-apoptotischen Proteine Bax, Bim und Bid bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Bcl-xL in CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion stärker exprimiert wurde als in PBMo. Weiterhin wurde durch fluorescence-activated cell sorting (FACS-Analyse) die zelluläre Proteinexpression der Bcl-2-Proteine bestimmt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Bax und Bcl-xL in CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion weniger exprimiert wurden als in PBMo, wobei durch sterische Blockade nur unaktiviertes Bcl-xL vom Antikörper erfasst werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass durch vermehrte Bcl-xL-Synthese und weniger unaktiviertem Bcl-xL, sowie einer verminderten Bax-Expression ein anti-apoptotischer Zustand in CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion vorherrscht.

Um zu ermitteln, ob sich die Protein-Regulation auf die Apoptose-Einleitung auswirkt, wurde der Austritt von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Cytosol quantifiziert. Die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt über eine Signalkaskade die Aktivierung von Effektorcaspasen, die zur Apoptose-Auslösung notwendig sind. Es konnte gezeigt werden, dass CBMo nach *E. coli*^{GFP}-Infektion weniger Cytochrom c freisetzen als PBMo.

Anhand vorhergehender Studien, die den Einfluss von Todesliganden wie CD95L und TNF- α auf den PICD und den Zelltod von sog. Bystander-

Monozyten (Monozyten, die keinen direkten Kontakt zum Pathogen haben) darstellen konnten, wurde eine Theorie zum Pathomechanismus des PICD von CBMO entwickelt: Phagozytierende CBMO erfahren Bcl-xL-vermittelt mehr anti-apoptotische Einflüsse als PBMO und zeigen eine geringere PICD-Rate. Über sezernierte Todesliganden wird in Bystander-Monozyten Apoptose ausgelöst, wobei CBMO weniger CD95L- und TNF- α -Sekretion zeigen, sodass weniger Bystander-CBMO sterben als PBMO.

Dies führt insgesamt zu einer verminderten Aufnahme apoptotischer Zellen und damit einhergehend zu einer verringerten Inhibition proinflammatorischer Zytokine, sodass eine verzögerte Terminierung der Immunreaktion stattfindet.

Dieses gestörte Gleichgewicht aus Initiierung und Terminierung der Immunreaktion könnte wesentlich zu der Entstehung von Komplikationen der Neugeborenenensepsis wie z.B der Bronchopulmonalen Dyplasie (BPD) oder der Nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) beitragen.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams-Chapman, I. and B.J. Stoll, Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. 19(3): p. 290-7.
2. Albee, L., B. Shi, and H. Perlman, Aspartic protease and caspase 3/7 activation are central for macrophage apoptosis following infection with *Escherichia coli*. *J Leukoc Biol*, 2007. 81(1): p. 229-37.
3. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition, 2002, New York: Garland Science, p. 554-559.
4. Annis, M.G., et al., Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J*, 2005. 24(12): p. 2096-103.
5. Annis, M.G., et al., There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1644(2-3): p. 115-23.
6. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1305-8.
7. Baran, J., et al., Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2001. 69(3): p. 1287-97.
8. Bartels, D.B., et al., Population based study on the outcome of small for gestational age newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2005. 90(1): p. F53-9.
9. Benjamin, D.K., Jr. and B.J. Stoll, Infection in late preterm infants. *Clin Perinatol*, 2006. 33(4): p. 871-82; abstract x.
10. Billen, L.P., et al., BCL-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLOS Biology*, 2008. 6(6): p. 1268-1280.
11. Bleicken, S., Strukturelle Untersuchungen der Konformationsänderungen im proapoptotischen Protein Bax und der räumlichen Anordnung des membranständigen Baxoligomers. *Naturwissenschaftliche Dissertation*, Universität München, 2008.
12. Bleicken, S., et al., Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *J Biol Chem*, 2010. 285(9): p. 6636-47.
13. Bohm, I. and H. Schild, Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol*, 2003. 5(1): p. 2-14.
14. Bouillet, P., et al., Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 1999. 286(5445): p. 1735-8.
15. Boyum, A., Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. 97: p. 77-89.
16. Boyum, A., Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. *Lymphology*, 1977. 10(2): p. 71-6.

17. Bracci, R. and G. Buonocore, Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate*, 2003. 83(2): p. 85-96.
18. Cain, K., et al., Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, 1999. 274(32): p. 22686-92.
19. Campos, C.B., et al., Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. *Cytometry A*, 2006. 69(6): p. 515-23.
20. Chan, S.L. and V.C. Yu, Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31(3): p. 119-28.
21. Chen, H., et al., The involvement of beta-actin in the signaling of transmembrane TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *J Leukoc Biol*, 2011. 89(6): p. 917-26.
22. Chen, L., et al., Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 2005. 17(3): p. 393-403.
23. Chipuk, J.E., et al., Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008a. 105(51): p. 20327-32.
24. Chipuk, J.E. and D.R. Green, How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 2008b. 18(4): p. 157-64.
25. Chipuk, J.E., et al., The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*, 2010. 37(3): p. 299-310.
26. Cortese, J.D., A.L. Voglino, and C.R. Hackenbrock, Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c. *Biochemistry*, 1998. 37(18): p. 6402-9.
27. Czabotar, P.E., P.M. Colman, and D.C. Huang, Bax activation by Bim? *Cell Death Differ*, 2009. 16(9): p. 1187-91.
28. Dehio, M., et al., Construction of versatile high-level expression vectors for *Bartonella henselae* and the use of green fluorescent protein as a new expression marker. *Gene*, 1998. 215(2): p. 223-9.
29. Dejean, L.M., et al., Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(5): p. 2424-32.
30. DeLeo, F.R., Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis*, 2004. 9(4): p. 399-413.
31. Dewson, G. and R.M. Kluck, Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 16): p. 2801-8.
32. Dewson, G., et al., Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ*, 2012. 19(4): p. 661-70.
33. Dewson, G., G.M. Walsh, and A.J. Wardlaw, Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils. Modulation by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 20(4): p. 720-8.

34. Dijkers, P.F., et al., Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, 2000. 10(19): p. 1201-4.
35. Distelhorst, C.W. and G.C. Shore, Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene*, 2004. 23(16): p. 2875-80.
36. Dockrell, D.H., et al., Immune-mediated phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae* are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis*, 2001. 184(6): p. 713-22.
37. Dreschers, S. und Gille, C., et al., Infection-induced bystander-apoptosis of monocytes is TNF-alpha-mediated. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e53589.
38. Dzhagalov, I., A. St John, and Y.W. He, The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood*, 2007. 109(4): p. 1620-6.
39. Edlich, F., et al., Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell*, 2011. 145(1): p. 104-116.
40. Ewings, K.E., et al., ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J*, 2007a. 26(12): p. 2856-67.
41. Ewings, K.E., C.M. Wiggins, and S.J. Cook, Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle*, 2007b. 6(18): p. 2236-40.
42. Feig, C. and M.E. Peter, How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol*, 2007. 37 Suppl 1: p. S61-70.
43. Fletcher, J.I., et al., Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(47): p. 18081-7.
44. Garcia-Saez, A.J., et al., Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry*, 2004. 43(34): p. 10930-43.
45. Gautier, F., et al., Bax activation by engagement with, then release from, the BH3 binding site of Bcl-xL. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(4): p. 832-44.
46. Gavathiotis, E., et al., BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol Cell*, 2010. 40(3): p. 481-92.
47. Gavathiotis, E., et al., BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 2008. 455(7216): p. 1076-81.
48. George, N.M., J.J. Evans, and X. Luo, A three-helix homooligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev*, 2007. 21(15): p. 1937-48.
49. Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al., Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? *Crit Care*, 2006. 10(3): p. R76.
50. Gille, C. und Dreschers, S., et al., The CD95/CD95L pathway is involved in phagocytosis-induced cell death of monocytes and may account for sustained inflammation in neonates. *Pediatr Res*, 2013. 73(4 Pt 1): p. 402-8.
51. Gille, C., et al., Phagocytosis and postphagocytic reaction of cord blood and adult blood monocyte after infection with green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli* and group B *Streptococci*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009a. 76(4): p. 271-84.

52. Gille, C., et al., Diminished phagocytosis-induced cell death (PICD) in neonatal monocytes upon infection with *Escherichia coli*. *Pediatr Res*, 2008. 63(1): p. 33-8.
53. Gille, C., et al., Clearance of apoptotic neutrophils is diminished in cord blood monocytes and does not lead to reduced IL-8 production. *Pediatr Res*, 2009b. 66(5): p. 507-12.
54. Gomez-Bougie, P., R. Bataille, and M. Amiot, Endogenous association of Bim BH3-only protein with Mcl-1, Bcl-xL and Bcl-2 on mitochondria in human B cells. *Eur J Immunol*, 2005. 35(3): p. 971-6.
55. Gorbenko, G.P., Structure of cytochrome c complexes with phospholipids as revealed by resonance energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1420(1-2): p. 1-13.
56. Grage-Griebenow, E., et al., Apoptosis in monocytes. *Eur Cytokine Netw*, 1998. 9(4): p. 699-700.
57. Hacker, H., et al., Caspase-9/-3 activation and apoptosis are induced in mouse macrophages upon ingestion and digestion of *Escherichia coli* bacteria. *J Immunol*, 2002. 169(6): p. 3172-9.
58. Hakem, R., et al., Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 1998. 94(3): p. 339-52.
59. Hentschel, J., et al., Population-based study of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants in Switzerland. *Eur J Pediatr*, 2005. 164(5): p. 292-7.
60. Hildeman, D.A., et al., Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*, 2002. 16(6): p. 759-67.
61. Holcroft, C.J., et al., Association of prematurity and neonatal infection with neurologic morbidity in very low birth weight infants. *Obstet Gynecol*, 2003. 101(6): p. 1249-53.
62. Hotchkiss, R.S., et al., The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat Med*, 2009. 15(5): p. 496-7.
63. Hotchkiss, R.S. and D.W. Nicholson, Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(11): p. 813-22.
64. Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, and I.E. Karl, Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis*, 2003. 35(9): p. 585-92.
65. Hsu, Y.T. and R.J. Youle, Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*, 1997a. 272(21): p. 13829-34.
66. Hsu, Y.-T.W., Keith G.; Youle, Richard J, Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Biochemistry*, 1997b. 94: p. 3668-3672.
67. Huttemann, M., et al., The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 2011. 11(3): p. 369-81.
68. Jendro, M.C., et al., Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potential mechanism for persistent infection. *Infect Immun*, 2000. 68(12): p. 6704-11.

69. Jeong, S.Y., et al., Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO J*, 2004. 23(10): p. 2146-55.
70. Jiang, X. and X. Wang, Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*, 2000. 275(40): p. 31199-203.
71. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006. 57(5): p. 545-53.
72. Kirschnek, S., et al., Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol*, 2005. 174(2): p. 671-9.
73. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007. 87(1): p. 99-163.
74. Kuwana, T., et al., BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 2005. 17(4): p. 525-35.
75. Kuwana, T., et al., Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002. 111(3): p. 331-42.
76. Letai, A., et al., Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002. 2(3): p. 183-92.
77. Leviton, A., et al., Persistence after birth of systemic inflammation associated with umbilical cord inflammation. *J Reprod Immunol*, 2011. 90(2): p. 235-43.
78. Li, P., et al., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997. 91(4): p. 479-89.
79. Lotem, J. and L. Sachs, Regulation of bcl-2, bcl-XL and bax in the control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ*, 1995. 6(6): p. 647-53.
80. Lüllmann-Rauch, R., Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage, 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, p. 267-271.
81. Marani, M., et al., Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(11): p. 3577-89.
82. Moulding, D.A., et al., BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol*, 2001. 70(5): p. 783-92.
83. Nicholls, P., Cytochrome c binding to enzymes and membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1974. 346(3-4): p. 261-310.
84. Oddo, M., et al., Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 1998. 160(11): p. 5448-54.
85. Ohta, K., et al., Immunoblot analysis of cellular expression of Bcl-2 family proteins, Bcl-2, Bax, Bcl-X and Mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues. *Int Immunol*, 1995. 7(11): p. 1817-25.
86. Okada, S., et al., A physiologic role of Bcl-xL induced in activated macrophages. *J Immunol*, 1998. 160(6): p. 2590-6.

87. Ott, M., et al., Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): p. 1259-63.
88. Ott, M., B. Zhivotovsky, and S. Orrenius, Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 2007. 14(7): p. 1243-7.
89. Petros, A.M., E.T. Olejniczak, and S.W. Fesik, Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1644(2-3): p. 83-94.
90. Peyerl, F.W., et al., Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Cell Death Differ*, 2007. 14(3): p. 447-52.
91. Piccotti, L., et al., Binding and release of cytochrome c in brain mitochondria is influenced by membrane potential and hydrophobic interactions with cardiolipin. *J Membr Biol*, 2004. 198(1): p. 43-53.
92. Pinheiro da Silva, F. and V. Nizet, Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*, 2009. 14(4): p. 509-21.
93. Pirnia, F., et al., Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ*, 2002. 9(9): p. 905-14.
94. Putcha, G.V., et al., Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron*, 2001. 29(3): p. 615-28.
95. Puthalakath, H. and A. Strasser, Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*, 2002. 9(5): p. 505-12.
96. Puthalakath; H. Huang, D.C.S.O.R., L. A.; King, S. M.; Strasser, A., The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell*, 1999. 3: p. 287-296.
97. Saleh, A., et al., Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): p. 17941-5.
98. Sanz, C., et al., The expression of Bcl-x is downregulated during differentiation of human hematopoietic progenitor cells along the granulocyte but not the monocyte/macrophage lineage. *Blood*, 1997. 89(9): p. 3199-204.
99. Savill, J., Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res*, 2000. 23(3-5): p. 173-4.
100. Schrag, S.J. and B.J. Stoll, Early-onset neonatal sepsis in the era of widespread intrapartum chemoprophylaxis. *Pediatr Infect Dis J*, 2006. 25(10): p. 939-40.
101. Schultz, C., et al., Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol*, 2004. 135(1): p. 130-6.
102. Sedlak, T.W., et al., Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(17): p. 7834-8.

103. Shinjyo, T., et al., Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(3): p. 854-64.
104. Stahnke, K., et al., Identification of deficient mitochondrial signaling in apoptosis resistant leukemia cells by flow cytometric analysis of intracellular cytochrome c, caspase-3 and apoptosis. *Apoptosis*, 2004. 9(4): p. 457-65.
105. Steimer, D.A., et al., Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood*, 2009. 113(12): p. 2805-15.
106. Stoll, B.J., et al., Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2002. 110(2 Pt 1): p. 285-91.
107. Stoll, B.J., et al., Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2010. 126(3): p. 443-56.
108. Sukumaran, S.K., S.K. Selvaraj, and N.V. Prasadarao, Inhibition of apoptosis by *Escherichia coli* K1 is accompanied by increased expression of BclXL and blockade of mitochondrial cytochrome c release in macrophages. *Infect Immun*, 2004. 72(10): p. 6012-22.
109. Susin, S.A., et al., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999. 397(6718): p. 441-6.
110. Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra, Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 2000. 103(4): p. 645-54.
111. Tapia, J.L., et al., Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J Pediatr (Rio J)*, 2006. 82(1): p. 15-20.
112. Tyurin, V.A., et al., Interactions of cardiolipin and lyso-cardiolipins with cytochrome c and tBid: conflict or assistance in apoptosis. *Cell Death Differ*, 2007. 14(4): p. 872-5.
113. Van Der Vliet, H.J., et al., Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol*, 1997. 110(2): p. 324-8.
114. Volk, H.D., Multiparameteranalysen von mononukleären Zellen mittels Durchflusszytometrie. *Immunologische Arbeitsmethoden 1991*, Jena: Gustav-Fischer Verlag.
115. Walter, L. and G. Hajnoczky, Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*, 2005. 37(3): p. 191-206.
116. Weber, S.U., et al., Induction of Bim and Bid gene expression during accelerated apoptosis in severe sepsis. *Crit Care*, 2008. 12(5): p. R128.
117. Wesche, D.E., et al., Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*, 2005. 78(2): p. 325-37.
118. Westphal, D., et al., Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(4): p. 521-31.

119. Whitfield, J., et al., Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron*, 2001. 29(3): p. 629-43.
120. Willis, S.N., et al., Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, 2005. 19(11): p. 1294-305.
121. Willis, S.N., et al., Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 2007. 315(5813): p. 856-9.
122. Wong, W.W. and H. Puthalakath, Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life*, 2008. 60(6): p. 390-7.
123. Wright, S.D., et al., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990. 249(4975): p. 1431-3.
124. Xiao, C., et al., Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 405-14.
125. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer, BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994. 369(6478): p. 321-3.
126. Zou, H., et al., An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 1999. 274(17): p. 11549-56.

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits durch die Fachzeitschrift *Pediatric Research* veröffentlicht sowie auf nationalen Kongressen und als Poster vorgestellt:

Fachzeitschrift:

Leiber A, Graf B, Spring B, Rudner J, Köstlin N, Orlikowsky TW, Poets CF, Gille C. Neonatal monocytes express antiapoptotic pattern of Bcl-2 proteins and show diminished apoptosis upon infection with *Escherichia coli*. *Pediatric Research*, 2014 Aug; 76(2), p 142-149.

Vorträge:

Leiber A, Gille Ch, Graf B, Spring B, Rudner J, Orlikowsky Th, Poets ChF. Regulation des Phagozytose induzierten Zelltodes von Monozyten über die Bcl-Protein-Familie. Forschungsretreat der Kinderklinik 2011, Reisensburg/Günzburg.

Leiber A, Graf B, Spring B, Poets ChF, Orlikowsky Th, Gille Ch. Die Regulation des Phagozytose induzierten Zelltodes durch die Proteine der Bcl-Familie unterscheidet sich bei neonatalen und adulten Monozyten. DGPI Jahrestagung 2012 in Mannheim.

Poster:

Leiber A, Gille Ch, Spring B, Rudner J, Orlikowsky Th, Poets Ch F. Einfluss der Proteine der Bcl-Familie auf die Regulation des Phagozytose induzierten Zelltodes neonataler Monozyten. Forschungskolloquium der Universität Tübingen 2011 in Tübingen.

9 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich habe die Versuche, die in den Abbildungen 1 und 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 dargestellt sind durchgeführt und konzipiert.

Frau Dr. Leiber hat die Versuche, die in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt sind durchgeführt und konzipiert.

Herr Dr. Gille war an der Konzeption der Studie beteiligt, er hat die praktischen Versuche betreut und das Manuskript korrigiert.

Herr Prof. Dr. Poets war an der Konzeption der Studie beteiligt, er hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, daher möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die mir die Erstellung der Dissertation ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian F. Poets für die Annahme als Doktorand, das aufmerksame Verfolgen und Hinterfragen der Fortschritte und die Begutachtung der Dissertationsschrift.

Ich möchte mich auch beim gesamten Neolab-Team für das nette Arbeitsklima und den freundschaftlichen Umgang bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Dr. Anja Leiber für die hervorragende Betreuung und Einarbeitung in die Methoden und Arbeitsweisen im Labor, die Ideen und Ratschläge zur Entwicklung des Themas und das Korrekturlesen.

Des Weiteren danke ich herzlich Dr. Christian Gille für das Überlassen des Themas, die vielen Überlegungen und Diskussionen zur Problemlösung und Weiterentwicklung der Arbeit und den ehrlichen Enthusiasmus, der mir immer Motivation verschaffte.

Außerdem möchte ich Dr. Bärbel Spring für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und die Aufmunterungen nach Fehlschlägen und Problemen danken.

Ich danke auch dem Kreißsaal-Team der Universitäts-Frauenklinik Tübingen für die Vorbereitung und Bereitstellung der Patientenproben.

Zum Ende dieser Arbeit gilt mein herzlichster Dank meiner Frau, meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Benjamin Graf
Geburtsdatum	22.09.1987
Geburtsort	Bremen
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1994-1998	Brüder-Grimm-Grundschule in Neustadt/Wstr.
1998-2007	staatl. Leibniz-Gymnasium in Neustadt/Wstr.
07/2008 – 03/2008	Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen des Zivildienstes

Studium

seit 04/2008	Humanmedizin Eberhard Karls Universität Tübingen
03/2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Promotion

2011- 2015	Promotionsarbeit an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung Neonatologie Prof. Dr. Ch. F. Poets
------------	--