

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Untersuchungen zur ER-Stress-induzierten Apoptose in
primären neutrophilen Granulozyten und ATRA-
ausdifferenzierten HL-60 Zellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Susanne Detmer

2017

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

gez.

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü

Korreferent: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten (PMN) sind Effektorzellen der angeborenen Abwehr mit einer mittleren Überlebensdauer im Bereich von Stunden. Die spontane Apoptose ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Zellzahlhomöostase dieser Zellen. Im Rahmen von Verletzungen oder Entzündungszuständen kann sich die Überlebensdauer von PMN um ein Vielfaches verlängern. Die Details dieser Regulation der Lebensspanne von PMN sind bisher kaum bekannt. Da PMN nicht nur pathogene Mikroorganismen abwehren, sondern auch für die Resolution von Inflammation von Bedeutung sind und über die Befähigung zur Destruktion von körpereigenem Gewebe verfügen, können Störungen der Zellzahlhomöostase sowohl zu einer erhöhten Infektanfälligkeit als auch zu einer unangemessenen Gewebsschädigung führen. In polytraumatisierten und kritisch kranken Patienten weisen periphere PMN eine deutliche Verzögerung der spontanen Apoptose auf. Zusätzlich konnte eine Hemmung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweges durch die Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Die daraus resultierende Überrepräsentation dieser Zellen ist vermutlich an der Entstehung von „multiplem Organ-Dysfunktions-Syndrom“ (MODS) und multiplem Organversagen (MOF) bei solchen Patienten beteiligt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern der Weg der Apoptoseinduktion ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Relevanz für die Apoptoseregulation in PMN aufweist. Zusätzlich sollte geklärt werden ob Neutrophilen-ähnliche, ausdifferenzierte HL-60 Zellen für zukünftige Studien als ER-Stress Modell für PMN herangezogen werden können. Die Untersuchungen der Reaktion von PMN und Neutrophilen-ähnlich ausdifferenzierten HL-60 Zellen auf die Behandlung mit verschiedenen ER-Stress Induktoren ergab eine sporadisch auftretende Apoptoseresistenz von PMN gegenüber Thapsigargin (TP), die nach der Behandlung mit Tunicamycin (TM) nicht beobachtet werden konnte. PMN von Polytrauma-Patienten am 10. post-traumatischen Tag wiesen gehäuft eine Resistenz gegenüber TP auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die ER-Stress-induzierte Apoptose in PMN von gesunden Spendern mit einer signifikanten Reduktion der MCL-1-Proteinlevel sowie einer Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität mit konsekutiver Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3/-7 einhergeht. Andere, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte, *Key-Player* der ER-Stressantwort wiesen keine signifikante und im Zusammenhang mit dem Apoptoseverhalten der Zellen schlüssige Regulation auf. Die Reaktion von ausdifferenzierten HL-60 Zellen auf ER-Stress unterschied sich erheblich von der in PMN beobachteten. Neutrophilen-ähnlich ausdifferenzierte HL-60 Zellen eignen sich demnach nicht als ER-Stress Modell für PMN.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| (s)XBP1 | <i>(spliced)X-box-binding protein 1</i> |
| °C | Grad Celsius |
| A1 | <i>BCL-2-related protein A1</i> |
| Abb. | Abbildung |
| Apaf-1 | <i>Apoptotic protease activating factor-1</i> |
| APL | Akute Promyelozyten-Leukämie |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| ARDS | <i>Acute respiratory distress syndrome</i> |
| ASC | Antikörper-sezernierende Zellen |
| ASK1 | <i>Apoptosis-signal-regulating kinase 1</i> |
| ATF4 | <i>Activating transcription factor 4</i> |
| ATF6 | <i>Activating transcription factor 6</i> |
| ATO | Arsentrioxid |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATRA | <i>All-trans retinoic acid</i> |
| Bad | <i>BCL-2-Antagonist of Cell Death</i> |
| BAK | <i>BCL-2 antagonist/killer</i> |
| BAX | <i>BCL-2-associated X protein</i> |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BCL-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BCL-XL | <i>B-cell lymphoma-extra large</i> |
| BH | <i>BCL-2 homology</i> |
| BI1 | <i>Bax inhibitor 1</i> |
| Bid | <i>BH3 interacting-domain death agonist</i> |
| Bik | <i>BCL-2-interacting killer</i> |
| Bim | <i>BCL-2-interacting mediator of cell death</i> |
| Bip | <i>Binding immunoglobulin protein</i> |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| Bzgl. | bezüglich |

| | |
|---------------|---|
| Ca | Calcium |
| CARD | <i>Caspase recruitment domain</i> |
| cDNA | <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> |
| Chop | <i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein</i> |
| Cu | Kupfer |
| DAMP's | <i>Danger-associated molecular patterns</i> |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DD | <i>Death domain</i> |
| DED | <i>Death effector domain</i> |
| DISC | <i>Death inducing signaling complex</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DR95 | <i>Death receptor 95</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eIF2 α | <i>Eukaryotic translation initiation factor 2α</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERAD | <i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> |
| ERSEs | <i>ER-Stress response elements</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FADD | <i>Fas-associated death domain</i> |
| FasL/FasR | FasLigand/FasRezeptor |
| Fc | <i>Fragment crystallizable</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> |
| FL-1-4 | Fluoreszenzdetektor 1-4 |
| FSC | <i>Forward scatter</i> |
| GADD 153 | <i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCS-F | <i>Granulocyte colony stimulating-factor</i> |
| gER | Glattes endoplasmatisches Retikulum |
| GM-CSC | <i>Granulocyte-macrophage colony-forming cells</i> |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> |
| GPT | UDP-N-acetylglucosamin-dolicholphosphat N-acetylglucosamin-1-phosphat transferase |

| | |
|-------------------|---|
| GRP 78 | <i>78 kDa glucose-regulated protein</i> |
| h | Stunde |
| HEK293T | <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> |
| HL-60 | <i>Human promyelocytic leukemia cells</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HWZ | Halbwertszeit |
| IAP | <i>Inhibitor of apoptosis protein</i> |
| IL | Interleukin |
| IRE1 α | <i>Inositol-requiring enzyme 1α</i> |
| ISS | <i>Injury Severity Score</i> |
| JNK | cJUN N-terminale Kinase |
| kDa | Kilo Dalton |
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat |
| KM | Knochenmark |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAM | <i>Mitochondria associated membranes</i> |
| MAPK | <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| MCL-1 | <i>Myeloid cell leukaemia sequence 1</i> |
| MEF | <i>Mouse embryonic fibroblasts</i> |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MODS | Multiorgandysfunktionssyndrom |
| MOF | <i>Multiorganfailure</i> |
| MOMP | <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MPT | <i>Mitochondrial permeability transition</i> |
| MW | Mittelwert |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat |

| | |
|-------------|--|
| NET | <i>Neutrophil extracellular traps</i> |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| NSCLC | <i>Non small cell lung cancer</i> |
| NTC | <i>No template control</i> |
| p | <i>Probability</i> (Signifikanzwert) |
| PAMP's | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCD | <i>Programmed cell death</i> |
| PERK | <i>Pancreatic ER-kinase</i> |
| pH | Pondus Hydrogenii |
| PJ | Propidiumiodid |
| PMN | Polymorphnukleäre Leukozyten |
| PP2A | Protein-Phosphatase 2 A |
| PS | Penicillin/Streptomycin |
| Puma | <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qPCR | <i>Quantitive polymerase chain reaction</i> |
| rel. | relative |
| rER | Raues endoplasmatische Retikulum |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s.u. | Siehe unten |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| Ser | Serin |
| SERCA | Sarko/Endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase |
| siRNA | <i>Small interfering ribonucleic acid</i> |
| SIRS | <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> |
| Smac/Diablo | <i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i> |
| SOFA | <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> |

| | |
|-------|--|
| sog. | So genannte/r/s |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| Std. | Stunde |
| tBid | <i>Truncated Bid</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBS-T | <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGBP | <i>Total blood granulocyte pool</i> |
| TM | Tunicamycin |
| TNF/R | Tumor Nekrose Faktor/Rezeptor |
| TP | Thapsigargin |
| TRADD | <i>TNFR-associated death domain</i> |
| TRAIL | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> |
| u.A. | Unter Anderem |
| UKD | Universitätsklinikum Düsseldorf |
| UPR | <i>Unfolded protein response</i> |
| UPREs | <i>UPR elements</i> |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| x g | Gravitation |
| z.B. | Zum Beispiel |
| Z.n. | Zustand nach |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | APOPTOSE | 1 |
| 1.2 | INITIATION DER APOPTOSE | 2 |
| 1.2.1 | Der extrinsische Signalweg | 3 |
| 1.2.2 | Der intrinsische Signalweg | 3 |
| 1.2.3 | Initiation über das endoplasmatische Retikulum | 5 |
| 1.3 | EXEKUTION DER APOPTOSE DURCH CASPASEN | 8 |
| 1.4 | NEUTROPHILE GRANULOZYTEN | 10 |
| 1.4.1 | Rolle der Apoptose für die PMN-Homöostase | 12 |
| 1.4.2 | Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der PMN-Apoptose | 15 |
| 2 | ZIELE DER ARBEIT | 18 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 3.1 | MATERIAL | 19 |
| 3.1.1 | Verbrauchsartikel und Zubehör | 19 |
| 3.1.2 | Geräte | 19 |
| 3.1.3 | Chemikalien | 20 |
| 3.1.4 | Lösungen | 21 |
| 3.1.5 | Puffer | 21 |
| 3.1.6 | Zellkulturmedien | 23 |
| 3.1.7 | Kits | 23 |
| 3.1.8 | Oligonukleotide | 23 |
| 3.1.9 | Antikörper | 24 |
| 3.2 | METHODEN | 24 |
| 3.2.1 | Probanden | 24 |
| 3.2.2 | Auftauen und Kultivierung von HL-60 Zellen | 25 |
| 3.2.3 | Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen mittels ATRA | 26 |
| 3.2.4 | Blutentnahme | 26 |
| 3.2.5 | Herstellung einer reinen Granulozyten-Population | 26 |
| 3.2.6 | Bestimmung der Zellzahl | 27 |
| 3.2.7 | Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie | 28 |
| 3.2.8 | RNA Isolation mittels Trizol | 30 |
| 3.2.9 | RNA-Aufreinigung | 31 |
| 3.2.10 | RNA-Konzentrationsbestimmung | 32 |
| 3.2.11 | Reverse Transkription | 32 |
| 3.2.12 | Real-Time quantitative PCR (qPCR) | 33 |
| 3.2.13 | Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration | 35 |
| 3.2.14 | Gelelektrophorese | 35 |
| 3.2.15 | Western Blot | 37 |
| 3.2.16 | Immundetektion | 38 |
| 3.2.17 | Blot-Stripping | 39 |
| 3.2.18 | Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1 | 39 |
| 3.2.19 | Aktivitätsbestimmung von Caspase-3/-7 und -9 mittels Caspase Assay | 40 |
| 3.2.20 | Statistik | 41 |
| 4 | ERGEBNISSE | 42 |
| 4.1 | EFFEKT VON ER-STRESS AUF DIE APOPTOSERATE VON PMN GESUNDER PROBANDEN SOWIE VON ATRA-AUSDIFFERENZIIERTEN HL-60 ZELLEN | 42 |
| 4.2 | EFFEKT VON ER-STRESS AUF DIE APOPTOSERATE VON PMN POLYTRAUMATISIERTER PATIENTEN | 44 |
| 4.3 | ER-STRESS-INDUZIERT VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN PMN VON GESUNDEN PROBANDEN UND IN ATRA-AUSDIFFERENZIIERTEN HL-60 ZELLEN | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.4 | ER-STRESS-INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN DER PROTEINEXPRESSION IN PMN GESUNDER PROBANDEN UND IN ATRA-AUSDIFFERENZIIERTEN HL-60 ZELLEN..... | 49 |
| 4.5 | ER-STRESS-INDUZIERTE REGULATION DER MCL-1 PROTEINEXPRESSION UND DER SPALTUNG VON CASPASE-4 IN PMN GESUNDER PROBANDEN MIT APOPTOSEANTWORT AUF TP (<i>RESPONDER</i>) UND TM..... | 52 |
| 4.6 | ER-STRESS-INDUZIERTE VERÄNDERUNG DER MITOCHONDRIALEN MEMBRANSTABILITÄT IN PMN GESUNDER PROBANDEN MIT APOPTOSEANTWORT AUF TP (<i>RESPONDER</i>) UND TM..... | 54 |
| 4.7 | ER-STRESS-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON CASPASE-3/-7 UND -9 IN PMN GESUNDER PROBANDEN MIT APOPTOSEANTWORT AUF TP (<i>RESPONDER</i>) UND TM..... | 56 |
| 5 | DISKUSSION..... | 58 |
| 5.1 | AUSBLICK..... | 69 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 72 |
| 7 | EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG..... | 79 |

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Der Begriff Apoptose [griech.: Apoptosis = das Abfallen] wurde 1972 von Kerr et. al. (1) eingeführt und beschreibt eine Form des aktiven, kontrollierten Zelltodes mit ganz bestimmten morphologischen Erscheinungen, die in Abb. 1 schematisch dargestellt sind.

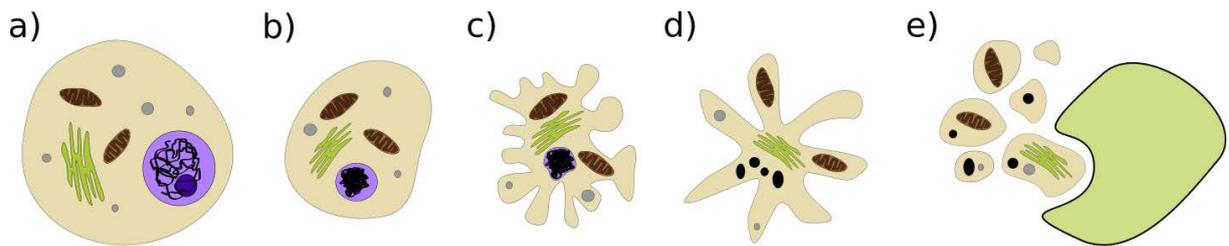


Abb. 1: Morphologische Erscheinungen der Apoptose. Ausgehend von der vitalen Zelle (a) kommt es im Rahmen der Apoptose nacheinander zu einer Zellschrumpfung mit Chromatinkondensation (b), Ausstülpungen der Plasmamembran, so genanntes „blebbing“ (c), Fragmentierung des Zellkerns (d) und Zerfall in so genannte „apoptotic bodies“, die daraufhin phagozytiert werden (e).

Zelluntergang, u.a. durch Apoptose, ist eine Voraussetzung für die Entstehung und Erhaltung komplexer Organismen. Dies gilt im Besonderen für die vier Bereiche Differenzierung (Ausbildung der Körperform, Entwicklung des ZNS), Immuntoleranzentwicklung, Zellzahlhomöostase und Elimination geschädigter Zellen. Es gibt eine Vielzahl von Pathologien, bei deren Entstehung und Verlauf die Regulation des Lebens und Sterbens der Zellen bedeutsam ist, woraus sich das große Interesse ableitet, Zelltodmechanismen zu verstehen und ggf. therapeutisch zu beeinflussen. Lange stand die Apoptose gemeinhin anerkannt im deutlichen Gegensatz zur Nekrose (im zellbiologischen Sinne), einer Form des unkontrollierten Zelltodes durch schädigende, insb. physikalische äußere Einflüsse, die mit Zellschwellung und Ruptur der Plasmamembran einhergeht. Dabei tritt Zellplasma in den Extrazellularraum aus und verursacht eine Immunantwort. Dieser Unterschied gilt als Kardinalunterschied zwischen Apoptose und Nekrose. Bei genauerer Betrachtung sind die Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose allerdings fließend und es gibt weitere Zelltodformen, die im Spektrum zwischen Apoptose und Nekrose anzusiedeln oder davon völlig unabhängig sind. Formen des Zelltodes, die mit dem Ablauf eines regulierten intrazellulären Programmes einhergehen, fasst man dabei als *Programmed cell death* (PCD)

zusammen. Die wichtigsten PCD-Formen sind Apoptose, Autophagie und programmierte Nekrose (2).

In ihrer Reinform ist die Apoptose, auch Type I PCD, eine Form des Zelltodes, die als Antwort auf äußere oder innere Stimuli eintritt, genetisch reguliert und evolutionär konserviert ist (3) und zu einer geordneten Destruktion und Entsorgung einer Zelle führt, ohne die umliegenden Zellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Vereinfacht lässt sich der Ablauf der Apoptose in drei Abschnitte gliedern: Initiation, Genregulation und Exekution durch Caspasen.

1.2 Initiation der Apoptose

Auslöser der Apoptose können spezifisch, z.B. durch Rezeptoren oder zytotoxische T-Zellen vermittelt, oder unspezifisch, wie z.B. bei hypoxiebedingter oder toxischer Zellschädigung sein. Ein weiterer zentraler Auslöser für Apoptose sind spezifische DNA-Schäden, die über unterschiedliche Wege Apoptose auslösen und somit zur Beseitigung von Zellen mit irreparabel beschädigtem Erbgut beitragen. Außerdem tragen Wachstumsfaktoren sowie die Bindung extrazellulärer Liganden an zellspezifische Rezeptoren zur Inhibition oder Initiation der Apoptose bei. Detaillierte Kenntnisse über die genauen Mechanismen der Apoptose in den verschiedenen Zellen unter verschiedenen Bedingungen versprechen viele therapeutische Ansatzpunkte.

Die Regulation pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Genprodukte als Reaktion auf verschiedene Einflüsse ermöglicht die Integration von Informationen zu der Entscheidung für oder gegen die Exekution der Apoptose. Die Rolle potentiell an der Regulation der Apoptose beteiligter Genprodukte und wiederum deren Regulation müssen für jeden Zelltyp gesondert untersucht werden. Trotz der Unterschiede im Detail gibt es einige Mechanismen, die unbestritten in fast allen Zellen in ähnlicher Art und Weise ablaufen sowie Gruppen von Genen und Proteinen, die eindeutig pro- oder anti-apoptotischen Effekten zuzuordnen sind. Die am besten erforschten Initiationswege der Apoptose sind der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Ein weiterer in den meisten Zellen nachweisbarer Initiationsweg geht vom endoplasmatischen Retikulum aus.

1.2.1 Der extrinsische Signalweg

Ausgangspunkt des extrinsischen Weges ist die Interaktion von extrazellulären Liganden mit membranständigen Todesrezeptoren. Die Todesrezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Familie und zeichnen sich durch eine zytoplasmatische *death domain* (DD) aus. Bekannte Vertreter sind der Fas-Rezeptor (FasR/CD95), der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und der *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptor 1 und 2, ihre Liganden sind Fas-Ligand (FasL/CD95L), TNF- α und TRAIL. Das Ligand-Rezeptor-Prinzip bietet die Möglichkeit der gezielten Regulation physiologischer Apoptose. So ist z.B. das FasR/FasL-System zentral für die Beseitigung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen. Die Bindung des passenden Liganden an seinen Todesrezeptor führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors, woraus eine Zusammenlagerung der cytoplasmatischen DD's im Sinne einer Plattform resultiert. An diese Plattform binden passende Adaptermoleküle z.B. *Fas-associated death domain* (FADD) oder *TNFR-associated death domain* (TRADD) mit ihrer eigenen DD. Während TRADD über eine Signalkaskade zunächst nur Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B aktiviert und nur unter Beteiligung von FADD oder anderen Adaptermolekülen Apoptose auslösen kann, enthält FADD eine *death effector domain* (DED), aufgrund derer über eine analoge Domäne des Proenzym Pro-Caspase-8 dieses rekrutiert werden kann (4). Die Verbindung von FasR mit FADD und Pro-Caspase-8 bezeichnet man als *death inducing signaling complex* (DISC) (5). Die Oligomerisation von Pro-Caspase-8 führt zur deren Aktivierung. Mit der Aktivierung von Caspase-8 beginnt die Exekutionsphase der Apoptose (s.u.).

1.2.2 Der intrinsische Signalweg

Weniger spezifisch im Hinblick auf die Auslöser und deswegen insgesamt auch häufiger ist die Einleitung der Apoptose über den intrinsischen bzw. mitochondrialen Weg. Verschiedenste Formen zellulären Stresses wirken dabei entweder in negativer Weise, wie z.B. das Fehlen von Wachstumsfaktoren oder Hormonen oder in positiver Weise, wie z.B. Toxine, Hypoxie oder virale Infektionen, die aktiv Apoptose auslösen (6). Während sich der genaue Ablauf vom apoptotischen Stimulus bis zur Einleitung der intrinsischen Apoptose je nach Auslöser unterscheidet und zahlreichen regulierenden Einflüssen ausgesetzt ist, ist das entscheidende und gemeinsame Moment in diesem Prozess die Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP). Die zentralen Moleküle bei der Regulation der mitochondrialen Membranpermeabilität während der intrinsischen Apoptose sind Proteine der so genannten BCL-2 (*B-cell lymphoma*

2)-Familie. Entsprechend der Organisation ihrer BH (*BCL-2 homology*)-Domänen unterscheidet man drei Gruppen: (i) pro-apoptotische BH3-*only*-Proteine wie Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) oder Bim (*BCL-2-interacting mediator of cell death*), die nur die BH3-Domäne enthalten und als Initiatoren der intrinsischen Apoptose agieren; (ii) anti-apoptotische BCL-2 Proteine mit mehreren BH-Domänen wie BCL-2 und MCL-1 (*myeloid cell leukaemia sequence 1*), die in der Lage sind pro-apoptotische BCL-2 Proteine zu inhibieren; (iii) pro-apoptotische BCL-2 Proteine mit mehreren BH-Domänen z.B. BAX (*BCL-2-associated X protein*) und BAK (*BCL-2 antagonist/killer*), so genannte Effektoren (7). Als Antwort auf zelluläre Stresssignale werden Proteine der BH3-*only* Gruppe aktiviert, und entfalten ihre pro-apoptotische Wirkung einerseits durch die Aktivierung der Effektoren BAX und BAK und andererseits durch die Inhibition der Sequestrierung von BAX und BAK durch anti-apoptotische Proteine wie MCL-1. Aktivierte, freie BAX und BAK Monomere, bilden homo-Oligomere, die sich in die äußere Mitochondrienmembran einlagern und dort zur Porenbildung führen. Untersuchungen an *knock-out* Mäusen haben gezeigt, dass BAX und BAK essentiell sind für die intrinsische Apoptose durch MOMP (8). Neben dem Verlust der Mitochondrienfunktion, unter anderem durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und der Freisetzung von caspasenunabhängigen Effektormolekülen wie Endonuklease G aus den Mitochondrien, spielt vor allem der Austritt der pro-apoptotischen Proteine Cytochrom C, *second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac/DIABLO) und Htra2/Omi für die Apoptose eine wichtige Rolle. Cytochrom C bindet im Zytosol an *Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1). Dies ermöglicht die Assoziation von Apaf-1 mit dATP. Apaf-1, verfügt über eine *Caspase recruitment domain* (CARD), die durch die Interaktion mit dATP exponiert wird. Sieben Cytochrom C/Apaf-1/dATP Komplexe lagern sich zum „Apoptosom“ zusammen (9). Im Zentrum dieser Plattform binden Pro-caspase-9 Moleküle mit ihrer eigenen CARD an Apaf-1 und werden dadurch aktiviert. Ähnlich wie beim extrinsischen Signalweg markiert die Aktivierung von Pro-Caspase-9 den Beginn der Exekutionsphase der Apoptose (s.u.). Smac/DIABLO und Htra2/Omi entfalten ihren pro-apoptotischen Effekt durch die Inhibition von *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP's), die ihrerseits Caspasen inhibieren also im Sinne einer Caspasen-Disinhibition (10) (11).

Zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptoseweg bestehen Verbindungen. Die im extrinsischen Signalweg auf die Aktivierung von Todesrezeptoren folgende Aktivierung von Caspase-8 ist nicht in allen Zellen ausreichend für die Einleitung der Exekutionsphase. In diesen Zellen ist eine proteolytische Spaltung des BH3-*only* Proteins BID durch Caspase-8 zu tBID (*truncated BID*) erforderlich, welches wiederum BAX und

BAK aktiviert und somit über MOMP zur Inhibition von IAP's und zum Ablauf der Apoptose führt (12). Anhand ihrer Fähigkeit allein rezeptorvermittelt oder aber nur unter zusätzlicher Beteiligung der Mitochondrien in die Apoptose zu gehen, unterscheidet man Zellen vom Typ I bzw. Typ II (13). Abb. 2 stellt vereinfacht die extrinsische und intrinsische Apoptose und deren Verbindung durch die Spaltung von Bid dar.

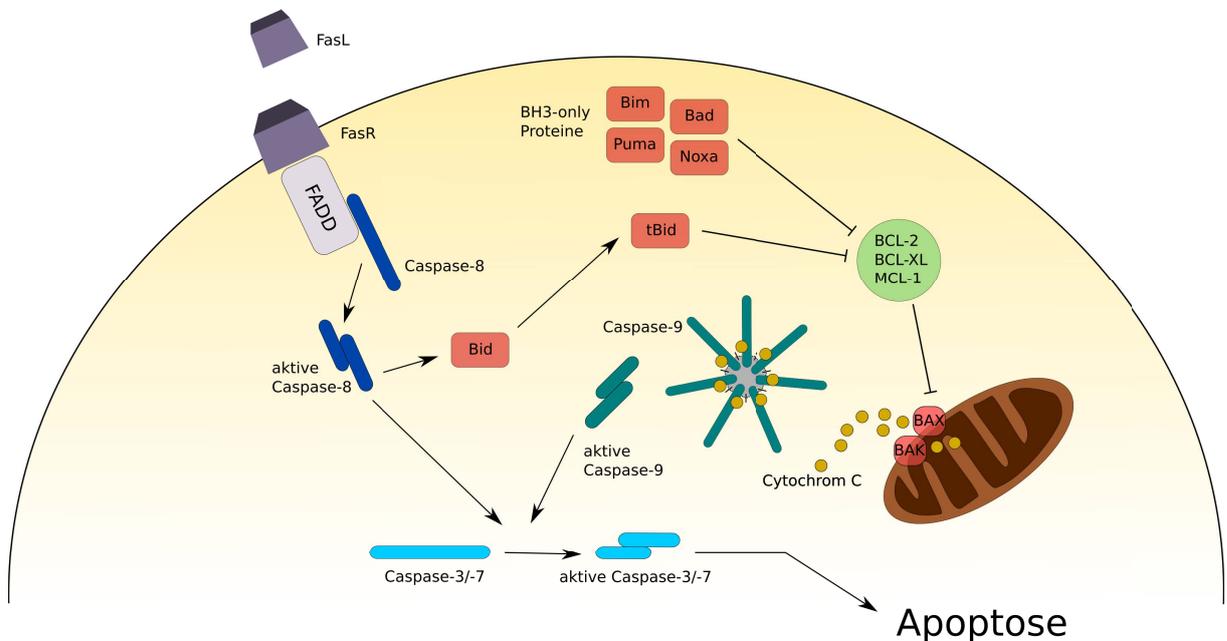


Abb. 2: Schematische Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Apoptoseinitiation. Vereinfachte Darstellung der rezeptorvermittelten Apoptose durch Bindung von Fas-Ligand (FasL) an den Fas-Rezeptor (FasR) mit Aktivierung von Caspase-8 und Spaltung von Bid in tBid. Vereinfachte Darstellung der Regulation der Mitochondrien-abhängigen Apoptose durch die Interaktion von Proteinen der BCL-2-Familie.

1.2.3 Initiation über das endoplasmatische Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Zellorganell eukaryotischer Zellen. Eine Membran durchzieht das Zytoplasma wie ein Netz und bildet so ein dynamisches Hohlraumsystem, das mit der Kernhülle kommuniziert und in direkter Nachbarschaft zum Golgi-Apparat liegt. Aufgrund der lichtmikroskopischen Erscheinung unterscheidet man glattes (gER) von rauem ER (rER). Diese unterschiedliche Erscheinung wird durch Ribosomen verursacht, die der Membran des rauhen ER, nicht aber der Membran des glatten ER anhaften. Glattes und raues ER liegen direkt nebeneinander, gehen ineinander über und sind funktionelle Abschnitte des Selben Organells. Die wichtigsten Funktionen des ER sind Proteinbiosynthese von sekretorischen- und Membranproteinen (rER), Lipidsynthese (gER) und Calcium-Homöostase der Zelle (gER).

Ein wichtiger Schritt im Rahmen der Proteinbiosynthese ist die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine. Die an den Ribosomen durch eine Pore in der ER-Membran in das ER-Lumen hinein synthetisierten Polypeptidketten werden dort unter der Beteiligung spezialisierter, Ca^{2+} -abhängiger ER-Proteine, der Chaperone, gefaltet. Dabei werden fehlerhaft gefaltete Proteine als solche erkannt und zum Abbau über das Proteasom in das Zytosol zurückgeführt. Diesen Mechanismus nennt man ER-assoziierte Protein-Degradation (ERAD) (14). Unter Bedingungen, die die Kapazität des ER für die Proteinfaltung verringern (ER-Stress), kann es aber dennoch zu einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen kommen. Eine mögliche Ursache ist die Störung der Homöostase des ER-Lumens. Eine Verminderung der intraluminalen Ca^{2+} -Konzentration, welche für die Funktion der Chaperone wichtig ist oder ein Verlust der oxidativen Umgebung im Lumen des ER, welche für die Ausbildung von Disulfid-Brücken nötig ist, verringern die Effektivität der Proteinfaltung. Auch Glukosemangel, eine Virusinfektion oder ein erhöhter Bedarf an sekretorischen Proteinen können zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine beitragen (15)(16).

Zu experimentellen Zwecken lässt sich ER-Stress mit verschiedenen Substanzen auch gezielt erzeugen. Gängige Substanzen, die auch im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommen sind, sind Thapsigargin (TP) und Tunicamycin (TM). TP ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der Sarko/Endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und stört die Ca^{2+} -Homöostase des ER. Das Resultat ist eine verminderte Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des ER mit konsekutiver Einschränkung der Aktivität Ca^{2+} -abhängiger ER-Chaperone und Anhäufung fehlgefalteter Proteine. TM ist ein Inhibitor der UDP-N-acetylglucosamin-dolicholphosphat N-acetylglucosamin-1-phosphat transferase (GPT). Dieses Enzym ist wichtig für die Glykoproteinsynthese im ER. Die Störung der Glykoproteinsynthese im ER führt ebenfalls zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER.

Als Reaktion auf die Anhäufung falsch gefalteter Proteine im ER wird eine zumindest in Teilen evolutionär konservierte Stress-Antwort initiiert. Diese so genannte *unfolded protein reponse* (UPR) (17) hat primär zum Ziel, die Homöostase im ER wieder herzustellen und die Integrität der Zelle zu sichern.

Die UPR verläuft im Wesentlichen über drei Achsen ausgehend von drei Transmembranproteinen des ER: *Pancreatic ER-kinase* (PERK); *activating transcription factor 6* (ATF6) und *Inositol-requiring kinase α 1* (IRE1 α). Bei der Aktivierung von PERK, ATF6 und IRE1 α spielt das ER-Chaperon Bip (*Binding immunoglobulin protein*; auch 78 *kDa glucose-regulated protein* bzw. GRP78) eine zentrale Rolle. Im Ruhezustand bilden Bip und die intraluminalen N-Termini dieser drei Transmembranproteine inaktive Komplexe. Angehäufte, fehlgefaltete Proteine im ER konkurrieren um die Bindung mit Bip, so dass

IRE1 α , PERK und ATF6 aus ihren Komplexen freigesetzt und aktiviert werden (18)(19). Während über die PERK-Achse vor allem durch die Phosphorylierung und konsekutive Inaktivierung von *eukaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α) eine generelle Inhibition der Translation erfolgt, um die zusätzliche Produktion falsch gefalteter Proteine zu vermeiden, (20), induzieren ATF6 direkt und IRE1 α indirekt die Transkription spezifischer UPR-Gene über *ER-Stress response elements* (ERSEs) und *UPR elements* (UPREs) der DNA. Solche Gene unterstützen vor allem ERAD und die Proteinfaltung (19), zu ihnen gehört auch das Gen für das ER-Chaperon Bip. Die Kommunikation zwischen ER und Zellkern im Rahmen von ER-Stress ist vereinfacht in Abb. 3 dargestellt.

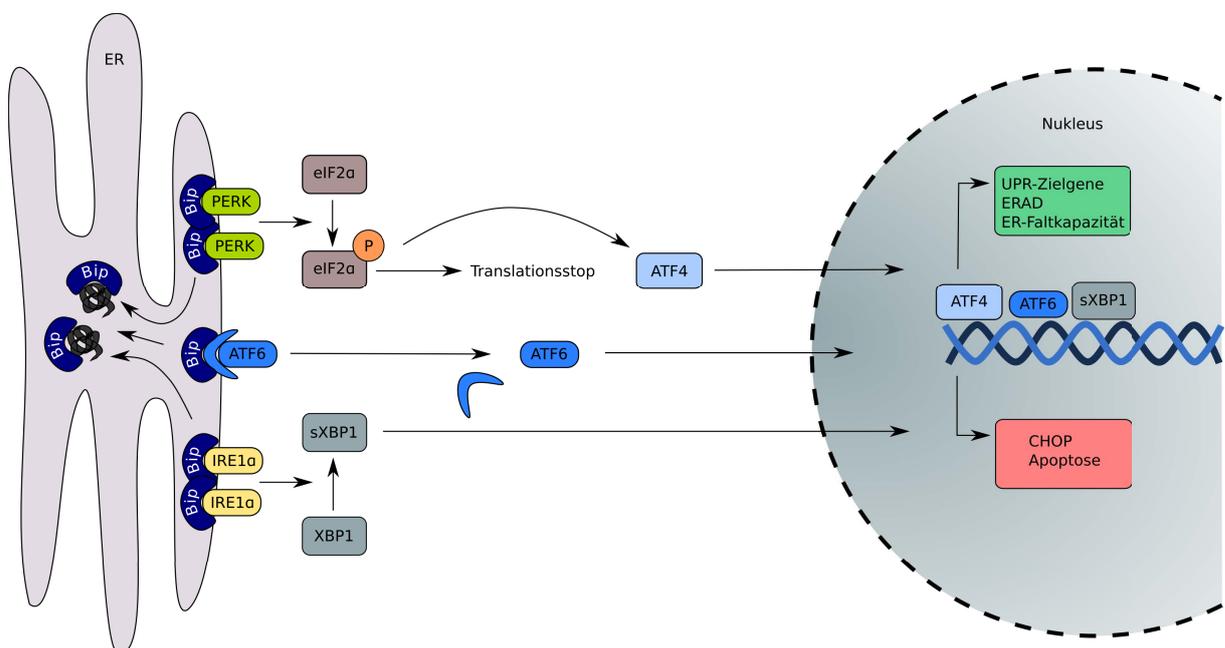


Abb. 3: Schematische Darstellung der „unfolded protein response“. Unter ER-Stress Bedingungen werden PERK, ATF6 und IRE1 α aus ihren Komplexen mit Bip freigesetzt. Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zum Translationsstopp, während die Transkriptionsfaktoren ATF4, ATF6 und sXBP1 im Zellkern die Transkription von UPR-Zielgenen stimulieren. In der Folge kommt es entweder zur Bewältigung des ER-Stress oder zur Induktion von Apoptose.

Reicht die Stressantwort nicht aus, um die ER-Homöostase wiederherzustellen, kann ausgehend vom ER der PCD eingeleitet werden, typischerweise in Form von Apoptose. Wie auch andere Formen des PCD ist die ER-Stress-induzierte Apoptose ein potenzieller Regulator der Zellzahlhomöostase und chronischer ER-Stress, und die konsekutive Apoptose sind inzwischen weithin anerkannt als pathogenetische Faktoren u.a. für neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes, kardiale Ischämie im Rahmen der Tumorbologie und bei Störungen des Immunsystems (15).

Die Herausforderung bei der Charakterisierung der Prozesse, die zu ER-Stress-induzierter Apoptose führen, liegt in der Vielzahl der parallel ablaufenden Signalwege als Reaktion auf ER-Stress. Dabei spielen Art und Intensität des auslösenden Stimulus, zeitliche Abläufe, *feedback*-Mechanismen und *cross-talk* zwischen den einzelnen Armen der UPR eine Rolle.

Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Aktivierung von IRE1 α sowohl zytoprotektiv als auch pro-apoptotisch wirken kann. Aktivierte IRE1 α verfügt über zytosolische Kinase- und Endoribonuklease-Aktivität. Die IRE1 α -RNase prozessiert die zuvor von ATF6 induzierte *X-box-binding protein 1* (XBP1)-mRNA. Die *Splicing*-Variante sXBP1 kodiert einen Transkriptionsfaktor, dessen Zielgene die UPR und ERAD unterstützen (21). Eine Überexpression von IRE1 α in *Human Embryonic Kidney 293 cells* (HEK293T) führte in den betroffenen Zellen allerdings zu Apoptose (22).

Während die zytoprotektiven Effekte einer Aktivierung von PERK und ATF6 in knock-out Studien gut belegt werden konnten (23)(24), ist die Bedeutung dieser beiden UPR-Achsen für die ER-Stress-induzierte Apoptose weniger gut verstanden. Eindeutig ist jedoch, dass alle drei UPR-Achsen an der Expression des Transkriptionsfaktors *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein* (Chop) beteiligt sind. Chop, auch *growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153* (GADD153), kommt ubiquitär vor und wird in der Folge von Zellstress, primär aber durch ER-Stress im Speziellen, induziert (25). Chop^{-/-} embryonische Mausfibroblasten sind gegenüber ER-Stress-induzierter Apoptose deutlich widerstandsfähiger (26). Eine Überexpression von Chop andererseits induziert Apoptose (27).

Die genauen Verbindungen zwischen ER-Stress und der Exekution der Apoptose bzw. ggf. auch anderer Formen des PCD sind noch nicht gut verstanden und Gegenstand intensiver Forschung. Eine weitreichende Beteiligung von Proteinen der BCL-2-Familie legt nahe, dass die ER-Stress-induzierte Apoptose eng mit der intrinsischen Apoptose verknüpft ist, bzw. dass ER-Stress die Maschinerie der intrinsischen Apoptose aktiviert.

1.3 Exekution der Apoptose durch Caspasen

Am Ende der jeweiligen Initiationskaskade steht der kontrollierte Abbau zellulärer Strukturen durch eine spezialisierte Familie von Cystein-Proteasen (Caspasen). Dabei handelt es sich um die gemeinsame Endstrecke der Apoptose. Unabhängig von den Auslösern der Apoptose spalten Caspasen schlussendlich eine schier unübersichtliche Vielzahl von Substraten, von denen viele eine Rolle für das Überleben respektive Sterben der Zelle spielen, z.B. Proteine des Zytoskelettes, Endonuklease-Inhibitoren, Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren. In gesunden Zellen liegen die Caspasen als inaktive Proenzyme (Zymogene) vor, die zunächst

aktiviert werden müssen. Bisher sind insgesamt 14 Säugetier-Caspasen bekannt, von denen 12 beim Menschen vorkommen (-1 bis -10, -12, -14) (28). Trotz der stetig wachsenden Erkenntnisse über die vielfältigen Funktionen der Caspasen ist immer noch eine funktionelle Einteilung der bisher bekannten Caspasen in apoptotische (-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) und inflammatorische (-1, -4, -5, -12) Caspasen gebräuchlich (28). Alternativ lassen sich die Caspasen auch globaler entsprechend der Länge ihrer Prodomänen in Initiator- und Effektorcaspasen einteilen (29):

| | Initiatorcaspasen | Effektorcaspasen |
|-----------|----------------------------------|-------------------|
| Caspase | -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -12 | -3, -6, -7, (-14) |
| Prodomäne | lang | kurz |

Die Initiatorcaspasen weisen in ihrer Prodomäne entweder das DED (*Death effector domain*) oder das CARD (*Caspase recruitment domain*) Motiv auf. Deren Interaktion mit den Adaptermotiven übergeordneter Proteine (z.B. DED mit FADD; CARD mit Apaf-1) als Reaktion auf apoptotische Stimuli führt zur Aktivierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 (extrinsischer Weg) bzw. Caspase-9 (intrinsischer Weg). Ob Caspasen auch an der Initiation ER-Stress-induzierter Apoptose beteiligt sind, ist bisher weniger gut verstanden. Die ursprüngliche Annahme einer Rolle für die ER-ständige Caspase-12 bei der Initiation ER-Stress-induzierter Apoptose wurde nicht zuletzt durch die Existenz eines Polymorphismus des Caspase-12 Genes, der die Expression eines funktionsfähigen Enzyms in den meisten Menschen verhindert, in Frage gestellt (30). Andererseits gibt es zumindest Hinweise für eine Rolle der primär inflammatorischen Caspase-4 bei der Initiation von ER-Stress-induzierter Apoptose (31).

Aufgrund der weitreichenden Konsequenzen einer Aktivierung von Initiatorcaspasen ist diese streng reguliert und erfordert oft die Rekrutierung eines Multi-Komponenten-Komplexes wie des Apoptosoms (32). Die Initiatorcaspasen-8 und -9 (*Upstream-Caspasen*) aktivieren ihrerseits proteolytisch die Effektorcaspasen -3/-6 und -7 (*Downstream-Caspasen*). Studien mit Caspase-3- und Caspase-7-defizienten Mäusen zeigten eine deutliche Apoptosedefizienz und belegen die Notwendigkeit dieser Effektorcaspasen für die Exekution der Apoptose (33). Kommt es zur Aktivierung der für die Apoptose relevanten Effektorcaspasen -3/-6 und -7, erfolgt eine systematische Destruktion von Schlüsselementen der apoptotischen Zelle, die zu den charakteristischen morphologischen Erscheinungen führt.

Am Ende des Apoptosevorganges steht die Beseitigung der apoptotischen Zelle durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen und Neutrophile

Granulozyten (Efferocytose). Gelingt die Phagozytose nicht rechtzeitig, kommt es zur sekundären Nekrose, zum Austritt zellulärer Bestandteile und somit eben doch zur Provokation einer Entzündungsantwort. Schlüsselmechanismen bei der Erkennung und Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten sind Membranveränderungen („*eat me*“ Signale) und Chemotaxis („*find me*“ Signale). Das bekannteste Phänomen an der Membran apoptotischer Zellen ist die Externalisierung des Membranlipides Phosphatidylserin (PS). Normalerweise ein Bestandteil der plasmatischen Seite der Zellmembran, kommt es bei apoptotischen Zellen regelmäßig zu einer Verlagerung von PS auf die extraplasmatische Seite (34), wo es von verschiedenen Rezeptoren und Strukturen auf Makrophagen erkannt wird.

1.4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu den zellulären Bestandteilen des Blutes und sind Teil der heterogenen Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten). Ihren Namen verdanken sie ihren histologisch sichtbar im Zytoplasma liegenden, proteinhaltigen Granula bzw. deren histologischer Anfärbbarkeit. Im Rahmen der Blutbildung (Hämatopoiese) im Knochenmark entstehen sie, neben eosinophilen und basophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Thrombozyten, aus myeloiden Vorläuferzellen (Myelopoiese). Dem gegenüber steht die Entwicklung der ebenfalls zu den Leukozyten zählenden Lymphozyten aus lymphoiden Vorläuferzellen (Lymphopoiese). In einer dritten Reihe entstehen die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) aus erythroiden Vorläuferzellen. Myeloide, lymphoide und erythroide Vorläuferzellen, entstehen ihrerseits aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark.

Im menschlichen Blut zirkulieren ca. 5000 – 10 000 Leukozyten, wovon ca. 40-60 % neutrophile Granulozyten sind (35). Die zweite größere Leukozytenfraktion bilden die Lymphozyten mit einem Anteil von 20-40 % (35). Zu jeweils deutlich geringeren Anteilen vervollständigen Monozyten, eosinophile- und basophile Granulozyten das Spektrum der Leukozyten, deren Aufgabe, als Teil des Immunsystems, vor allem die Abwehr von Krankheitserregern und die Regulation von Inflammation ist. Aufgrund ihrer quantitativen Bedeutung und mit ihrer komplexen Funktionalität bilden die neutrophilen Granulozyten die so genannten „*first line of defense*“ bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen.

Nach ihrer *Granulocyte colony-stimulating factor* (GCS-F)-gesteuerten Reifung im Knochenmark (KM) verbleibt ein Teil der Granulozyten dort und bildet die Knochenmarksreserve, die auf 6×10^{11} Zellen geschätzt wird (36). Andere Granulozyten werden in den Blutkreislauf freigesetzt und bilden den sog. *total blood granulocyte pool* (TBGP), ca. 65×10^7 Zellen/kg, der sich wiederum zu ungefähr gleichen Anteilen in einen

frei zirkulierenden und einen marginalen (randständigen, dem Endothel anhaftenden) Pool unterteilt (37). Diese drei Kompartimente unterliegen einer Regulation. So führen z.B. körperliche Anstrengung und Adrenalin zu einer Verlagerung von Granulozyten aus dem Marginalpool in den zirkulierenden Pool, während bakterielle Endotoxine zu einer Vergrößerung sowohl des marginalen als auch des zirkulierenden Pools durch eine Mobilisation der Knochenmarksreserve führen (37).

Ein zentraler Aspekt der Physiologie neutrophiler Granulozyten ist das so genannte *Priming*. Zirkulierende Neutrophile sind primär funktionell inaktiv. Für die volle Entfaltung ihrer Effektorfunktionen müssen diese Zellen sowohl geprimed als auch aktiviert werden. Dabei führt der Kontakt mit bestimmten Priming-Agents wie z.B. LPS, GM-CSF, ATP oder TNF- α zu einer Potenzierung der funktionellen Antwort, die in einem zweiten Schritt, durch einen möglicherweise folgenden, aktivierenden Stimulus, erst ausgelöst wird (38).

Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf in periphere Gewebe im Sinne einer Entzündungsreaktion ist das Ergebnis einer komplexen, räumlich und zeitlich gestaffelten Chemokin- und Zytokinfreisetzung. Deren Ausgangspunkt sind, durch PAMP's (*pathogen-associated molecular patterns*) im Zusammenhang mit Infektionen, bzw. DAMP's (*danger-associated molecular patterns*) als Signal für Zellzerstörung, aktivierte, gewebsständige Immunzellen wie Makrophagen oder Mastzellen (39)(40). Mit dem Blutkreislauf gelangen neutrophile Granulozyten an den Ort der Entzündung, um dort durch das von den Entzündungsmediatoren entsprechend veränderte Endothel chemotaktisch, entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen, Zytokinen und Lipidmediatoren, in das periphere Gewebe einzuwandern (Extravasation) (41). Im Gewebe entfalten sie eine Vielzahl antimikrobiologischer Effekte: Phagozytose, Degranulation mit Freisetzung spezialisierter Proteine, Peptide und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Formation von NETs (*neutrophil extracellular traps*) (42).

Dabei wirken die freigesetzten Proteasen, Hydrolasen und die oxidative Inaktivierung von gewebsständigen Protease-Inhibitoren recht unspezifisch und schädigen nicht nur pathogene Mikroorganismen, sondern zerstören auch körpereigenes, gesundes Gewebe (43). In einem kontrollierten Rahmen ist diese Gewebsdestruktion allerdings durchaus als physiologisch zu betrachten und unterstützt eine erfolgreiche Abwehr. Neben den unmittelbaren Abwehrfunktionen sind die Neutrophilen aber auch sowohl für den weiteren Verlauf der Immunantwort als auch für deren Beendigung relevant. Aktivierte Neutrophile rekrutieren zunächst weitere Neutrophile (39)(40). Die Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen im entzündlichen Gewebe hingegen führt durch einen negativen *feedback-loop*

über die IL-23 - IL-17 - GCS-F-Achse zu einer verminderten Produktion von Neutrophilen im Knochenmark (44). Außerdem sind neutrophile Granulozyten durch die Interaktion z.B. mit Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen auch an der Orchestrierung einer integrativen Immunantwort beteiligt (45)(46). Somit sind neutrophile Granulozyten *Key-Player* bei der Regulation von Inflammationszuständen.

Aufgrund ihrer variablen und im reifen Zustand stark segmentierten Kernform werden sämtliche Granulozyten auch als „polymorphnukleäre Leukozyten“ (PMN) bezeichnet. Im Folgenden wird die Abkürzung PMN synonym für neutrophile Granulozyten verwendet.

1.4.1 Rolle der Apoptose für die PMN-Homöostase

PMN sind terminal ausdifferenzierte, kurzlebige Zellen mit einer Produktionsrate im Knochenmark von 5×10^{10} - 10×10^{10} / Tag und einer Halbwertszeit im Blutkreislauf von 6-8 h (36). Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Erregerabwehr und ihrer Befähigung zur Zerstörung von körpereigenem Gewebe durch die Freisetzung toxischer Substanzen ist eine strenge Kontrolle der Anzahl verfügbarer PMN essentiell. Eine verminderte Anzahl von PMN (Neutropenie) hat eine erhöhte Anfälligkeit für schwere bakterielle, und Pilz- Infektionen zur Folge, während eine dauerhaft gesteigerte Aktivität von PMN, u.a. aufgrund mangelnder Elimination, durch die anhaltende Freisetzung von Proteasen, Hydrolasen und Oxidantien im peripheren Gewebe zu erheblicher Gewebsdestruktion führen kann (43)(47).

Die Regulation der Anzahl zirkulierender PMN erfolgt über verschiedene Mechanismen: Produktionsrate im KM; Freisetzung aus dem KM; Margination vs. Mobilisation im Gefäßsystem verschiedener Organe sowie Elimination von PMN durch spontane Apoptose und anschließende Phagozytose durch Makrophagen in KM, Leber und Milz sowie im peripheren Gewebe.

Der Apoptose kommt als Regelgröße für die Zellzahlhomöostase von PMN eine wesentliche Rolle zu. Sowohl externe Stimuli wie Zytokine und Chemokine als auch die genetische Programmierung der PMN sind für deren Überlebensdauer bedeutsam. Alternde PMN werden spontan apoptotisch und werden daraufhin von Makrophagen via Phagozytose beseitigt (48). Werden PMN jedoch zum Ort einer Entzündung rekrutiert, treffen sie dort auf verschiedene Chemokine, Zytokine und bakterielle Endotoxine, die anti-apoptotische Effekte auf PMN haben, deren Überlebensdauer signifikant verlängern und die volle Entfaltung ihrer antimikrobiellen Effektorfunktionen ermöglichen (49).

Die Regulation der Apoptose in PMN wird aufgrund ihrer Bedeutung für den erfolgreichen Umgang des Organismus mit Infektion und Inflammation intensiv erforscht und weist einige Besonderheiten auf. Ein Kernmerkmal von PMN ist die spontane Apoptose. Auch ohne äußere Einflüsse werden PMN nach kurzer Zeit sowohl *in vivo* als auch *in vitro* apoptotisch und lassen sich daher auch nur schlecht kultivieren (50). Die spontane Apoptose ist ein intrinsischer Prozess, dessen ursprünglicher Auslöser bisher nicht genau bekannt ist und der durch zahlreiche äußere Einflussfaktoren verlangsamt oder beschleunigt werden kann (51)(52).

PMN verfügen über ein ihnen eigenes Repertoire an Systemen, die an der Regulation der spontanen Apoptose beteiligt sind. Die Vorstellung, dass es sich bei der spontanen Apoptose um einen primär intrinsischen Vorgang handelt, obwohl auch extrinsische Apoptose in PMN nachweisbar ist, wird dabei von der Beobachtung gestützt, dass die spontane Apoptoserate in PMN von Mäusen mit dysfunktionalem FasR/FasL nicht beeinträchtigt ist (53). Darüber hinaus gehören PMN zu den Typ II Zellen, d.h. Stimulation des FasR allein reicht bei Ablation des mitochondrialen Weges nicht aus um Apoptose auszulösen (54). Dennoch spielt z.B. durch Makrophagen parakrin ausgelöste, Fas-induzierte Apoptose eine Rolle bei der Elimination von PMN im entzündlichen Gewebe (55).

Von den PMN-spezifischen, pro-apoptotischen Mechanismen, die ausführlich an anderer Stelle erörtert werden (56)(57)(58), kommen insbesondere zwei Systeme in Betracht, die spontane Apoptose auszulösen: die Generation von intrazellulären ROS durch die NADPH-Oxidase und die Veränderung des besonderen Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen in PMN (56).

Pro-apoptotische BCL-2-Proteine in PMN zeichnen sich durch eine lange HWZ und extreme Stabilität selbst unter Bedingungen, die die PMN Apoptose verzögern aus, während die exprimierten anti-apoptotischen BCL-2 Proteine eine äußerst kurze HWZ aufweisen und einer Regulation unterliegen (59). In Kombination mit der Beobachtung, dass in PMN eine generelle Inhibition der Proteinsynthese ausreicht, um Apoptose zu beschleunigen, (60) lässt sich daraus ableiten, dass die kontinuierliche Neusynthese der kurzlebigen, anti-apoptotischen BCL-2 Proteine für das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen essentiell ist. Tabelle 1 gibt das bisher bekannte Expressionsprofil von BCL-2 Proteinen in PMN wieder (56).

| Pro-apoptotische Effektoren | BH3- <i>only</i> Proteine | Anti-apoptotische BCL-2 Proteine |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| BAX | BAD | MCL-1 |
| BAK | BID | A1 |
| | BIK | BCL-xl |
| | Bim | |

Tabelle 1: Expressionsprofil von Proteinen der BCL-2-Familie in humanen PMN.

Reife PMN exprimieren im Gegensatz zu unreifen PMN, und anders als die meisten anderen Zellen, kein BCL-2 (61). Während BCL-xl und A1 nur in relativ geringen Mengen nachgewiesen werden konnte, scheint MCL-1 in PMN quantitativ und funktionell das wichtigste anti-apoptotische BCL-2 Protein zu sein. Es konnte hinreichend gezeigt werden, dass MCL-1 Level in PMN eng mit deren Überleben korrelieren (62). Eine verminderte MCL-1 Expression in alternden PMN stellt daher einen plausiblen Mechanismus für die spontane Apoptose dar (56).

Auch das pro-apoptotische BH3-*only* Protein Bim wird in PMN exprimiert und spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation der intrinsischen Apoptose. Bim besitzt die Fähigkeit, nicht nur mit anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen, sondern auch direkt mit pro-apoptotischen Effektor-BCL2-Proteinen zu interagieren. Im Gegensatz zu BH3-*only* Proteinen, die nur mit anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen interagieren, sogenannten *Sensitizern*, bezeichnet man Bim daher auch als direkten Aktivator der Apoptose (63). Anders als andere BH3-*only* Proteine bindet Bim relativ unselektiv alle anti-apoptotischen BCL-2 Proteine. Dementsprechend gravierende Folgen hat eine Dysregulation der Bim-Expression. Eine Überexpression kann Apoptose auslösen, während Bim-Defizienz zu einem Überschuss lymphoider und myeloider Zellen führt (64). Bim^{-/-} PMN von Mäusen zeigten eine deutliche Verzögerung der spontanen Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug in Zellkultur sowie eine verminderte Apoptose nach der Inkubation mit zytotoxischen Substanzen (65).

PMN exprimieren die Caspasen -1, -3, -4, -6, -7, -8, -9, -14 (56). Wie auch in den meisten anderen Zellen spielen im Rahmen der extrinsischen und intrinsischen Apoptose in PMN die Aktivierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 und -9 sowie der Effektorcaspase -3, -6 und -7 eine zentrale Rolle (66)(67).

In einer Arbeit aus dem Jahr 2010 zeigten Binet et al. zum ersten Mal, dass *Key-Player* der ER-Stress-induzierten Apoptose auch in PMN exprimiert und aktiviert werden, und dass Caspase-4 in humanen PMN auch auf Proteinebene exprimiert wird (68). Die Bedeutung von ER-Stress für die Regulation der PMN-Apoptose ist weitgehend unklar.

1.4.2 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der PMN-Apoptose

Inflammation ist ein primär physiologischer Vorgang und kennzeichnet die Aktivität des Organismus, um pathogene Keime unschädlich zu machen und Gewebsschäden zu beheben. Im Idealfall kommt es nach erfolgreicher Erregerabwehr, bzw. der Kontrolle der Gewebsschädigung zur vollständigen Resolution der Entzündung mit Wiederherstellung der Gewebshomöostase. Die ursprüngliche Vorstellung, dass die Beendigung einer Entzündungsreaktion ein rein passiver Prozess sei, bei dem allein die Beseitigung des Stimulus ausreiche, um die Entzündung ausklingen zu lassen, ist heute abgelöst von der Erkenntnis, dass viele biochemische Vorgänge die Resolution der Inflammation aktiv steuern (69).

PMN sind die wichtigsten Effektorzellen der angeborenen Abwehr. Eine Entzündungsreaktion ist u.a. gekennzeichnet durch die massenhafte Rekrutierung von PMN aus dem Blutkreislauf an den Ort der Schädigung. Die durch lokale Einflüsse verlängerte Lebensdauer der PMN führt zur erwünschten Akkumulation am Ort der Entzündung und zur vollen Entfaltung der PMN-Effektorfunktionen. Sowohl für eine adäquate Begrenzung der mit der PMN-Aktivierung einhergehenden Gewebsdestruktion als auch für eine effektive Einleitung der Resolutionsphase mit Rekonstruktion des Gewebes ist die PMN Apoptose von höchster Relevanz. Ein Zusammenhang zwischen verzögerter PMN Apoptose und verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, wie Pankreatitis (70), *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) (71), Sepsis (72) und Rheumatoider Arthritis (73), konnte gezeigt werden, und eine MPO-induzierte Verzögerung der PMN Apoptose führte im Mausmodell für spontane Inflammationsresolution zu einer Verlängerung der Entzündung (74).

Der offenkundige Effekt der Apoptose von PMN ist eine deutliche Reduktion ihrer primären, pro-inflammatorischen Funktionen sowie die sichere Entsorgung ihres toxischen Arsenal. Doch die PMN Apoptose ist auch auf spezifischere Art und Weise an der Resolution von Entzündungen beteiligt. So verändert die Phagozytose von apoptotischen PMN den Phänotyp pro-inflammatorischer Makrophagen, so dass die Expression anti-inflammatorischer Zytokine und die Initiierung der Gewebsreparatur in den Vordergrund treten (75).

Ein massives Trauma, eine post-ischämische Nekrose oder eine Reanimation, können unabhängig von infektiösen Ursachen eine Entzündungsreaktion auslösen (76). Die nachfolgende, systemische Traumareaktion („host defense response“) dient der Abschottung von Schadenszonen, dem Abbau von nekrotischem Gewebe und der Induktion der Regeneration, wobei Art, Stärke und Dauer des Traumas, die Intensität der Immunreaktion bedingen (77). Bei Polytrauma-Patienten mit ausgedehnten Verletzungen entwickelt sich

i.d.R. ein so genanntes „*Systemic Inflammatory Response Syndrome*“ (SIRS). Ein Polytrauma ist dabei definitionsgemäß ein Syndrom von Verletzungen mehrerer Körperregionen mit einem *Injury Severity Score* (ISS) ≥ 17 , die alleine oder in Kombination sowie akut und/oder im Verlauf lebensbedrohlich sind (77). Tabelle 2 gibt die SIRS-Kriterien wieder, von denen definitionsgemäß mindestens zwei erfüllt sein müssen, damit ein SIRS vorliegt.

| SIRS-Kriterien | |
|----------------|---|
| 1 | Herzfrequenz > 90/min |
| 2 | Atemfrequenz > 20/min bzw. Hyperventilation mit PaCO ₂ < 32 mmHg |
| 3 | Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C |
| 4 | Leukozytenzahl > 12 000/mm ³ oder < 4 000/mm ³ oder > 10% unreife PMN im Diff.-BB |

Tabelle 2 :Kriterien für das Vorliegen von SIRS. Auszug aus (77).

SIRS ist ein anhand von klinischen Parametern geprägter und recht unspezifischer Begriff für eine systemische Reaktion auf infektiöse und nicht-infektiöse Insulte mit pro- und anti-inflammatorischen Komponenten unter der Beteiligung von Mediatoren (Zytokinen, Chemokinen, Komplementfaktoren u.a.) und Effektorzellen (PMN, Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen) (78)(79). Der als SIRS bezeichnete Zustand erhöhter Alarmbereitschaft des Immunsystems bietet Chancen und Risiken. Eine starke und anhaltende systemische Entzündungsreaktion ist mit der Entwicklung eines Multiorgandysfunktiosyndroms (MODS) bzw. von multiplen Organversagen (MOF) mit Parenchymzellschäden, Endothelzellschäden mit konsekutivem, generalisiertem „*capillary-leak*“-Syndrom und mit Mikrozirkulationsstörungen assoziiert (77). Die genauen Mechanismen dieser Abfolge sind noch weitgehend unklar und spezifische, therapeutische Ansätze fehlen bisher (78).

Es gibt einige Indizien für eine Rolle von PMN bei der Pathogenese der Gewebeschädigung, die letztlich zu MODS bzw MOF führt. Roumen et al. zeigten 1995 eine Korrelation zwischen dem Elastase-Gehalt im Plasma von Traumapatienten als Maß für die Aktivierung von PMN und dem *outcome* der Patienten. Dabei war der Elastase-Gehalt schon ab Tag 2 nach dem Trauma signifikant erhöht bei den Patienten, die im Verlauf ein MOF entwickelten bzw. starben (80). Andere Gruppen konnten zeigen, dass PMN von Traumapatienten *in vivo* unmittelbar nach dem Ereignis sowohl maximal geprimed als auch aktiviert werden und daraufhin *in vitro* deutlich mehr gewebstoxische ROS freisetzen als die PMN von gesunden Probanden (81). Außerdem zeigten PMN in Trauma-Patienten eine besondere Kinetik (82). Sowohl in Patienten, die im Verlauf ein MOF entwickelten, als auch in solchen, die kein

MOF entwickelten, stieg die Anzahl zirkulierender PMN prostraumatisch an und erreichte nach ca. 3 h einen *Peak*, gefolgt von einer Abnahme der peripheren Zellzahl. Dabei zeigten die Patienten, die im Verlauf ein MOF entwickelten, 12 h post-traumatisch eine signifikant stärkere Reduktion der Anzahl zirkulierender PMN, vereinbar mit einer stärkeren Sequestrierung aktivierter PMN in verschiedene Endorgane mit konsekutiver Gewebsschädigung. Wenn PMN, die in der Zirkulation geprimed wurden, vermehrt in periphere Gewebe einwandern und dort durch einen zweiten, niederschweligen Stimulus aktiviert werden, tragen sie sehr wahrscheinlich zur Schädigung primär nicht betroffener Gewebe bei („*second-hit*“ Hypothese) (82).

Darüber hinaus beeinflussen generalisierte Inflammationszustände wie SIRS und Sepsis die Apoptoserate von PMN. Sepsis ist dabei, nach der letzten Definition vom Februar 2016, eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion verursacht durch eine dysregulierte Reaktion auf eine Infektion“ (83), wobei die Evaluation der Organdysfunktion anhand des so genannten SOFA-Score erfolgt (84). Biffi et al. zeigten in einer Studie mit 12 schwer verletzten Patienten eine deutliche Verzögerung der spontanen Apoptose der PMN von Patienten sowie einen apoptoseverzögernden Effekt von Patientenserum auf normale PMN (85). Diese Beobachtung konnten in Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe bestätigt und darüber hinaus GM-CSF als anti-apoptotischer Faktor im Serum traumatisierter Patienten identifiziert werden (86). Eine andere Gruppe zeigte eine verminderte Aktivität von Initiator- und Effektorcaspasen für die Apoptose in PMN von Sepsispatienten (87).

Vor dem klinischen Hintergrund einer wahrscheinlichen Assoziation verzögerter PMN-Apoptose in Trauma- und Sepsispatienten mit der Entwicklung von MODS und MOF bei Polytraumatisierten und kritisch kranken Patienten sollte in dieser Arbeit die Relevanz von ER-Stress für die PMN-Apoptose untersucht werden.

2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Effekte von ER-Stress auf das Apoptoseverhalten von neutrophilen Granulozyten und Neutrophilen-ähnlich ausdifferenzierten HL-60 Zellen. Therapeutische Relevanz besteht vor dem Hintergrund eines beschriebenen Zusammenhanges zwischen einer Verzögerung der spontanen Apoptose in Neutrophilen und einem protrahierten Verlauf verschiedener entzündlicher Erkrankungen. Inwiefern ER-Stress-induzierte Apoptose für die Regulation der Überlebensdauer von neutrophilen Granulozyten von Bedeutung ist, ist bisher nicht bekannt. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit im Wesentlichen drei Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie beeinflussen die ER-Stress Induktoren TP und TM das Apoptoseverhalten von neutrophilen Granulozyten bzw. Neutrophilen-ähnlich ausdifferenzierten HL-60 Zellen?
- 2) Werden *Key-Player* der ER-Stress-induzierten Apoptose, deren Bedeutung für andere Zellarten belegt ist, auch in neutrophilen Granulozyten im Rahmen von ER-Stress reguliert?
- 3) Können HL-60 Zellen für zukünftige Studien als Modell für ER-Stress-induzierte Apoptose in neutrophilen Granulozyten verwendet werden, um die schwierige Akquirierung und Kultivierung von Spenderzellen zu umgehen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden neutrophile Granulozyten von freiwilligen, gesunden Spendern und ausdifferenzierte HL-60 Zellen mit den ER-Stress Induktoren TP und TM behandelt, die prozentuale Apoptoserate mittels FACS-Analyse bestimmt und die Regulation der Gen- und Proteinexpression der im ER-Stress etablierten Genprodukte Bip, Chop, Bim und Caspase-4 untersucht. Zur besseren Charakterisierung der ER-Stress-induzierten Apoptose wurde die mitochondriale Beteiligung auf der Basis der Depolarisierung der Mitochondrienmembran beurteilt. Außerdem wurde die Proteinexpression von MCL-1 im Rahmen von ER-Stress untersucht, einem Protein, dessen intrazelluläres Level in neutrophilen Granulozyten eng mit deren Überlebensdauer korreliert. In einem Nebenzweig wurde auch die Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten nach TP und TM untersucht, die von polytraumatisierten Patienten isoliert wurden, um eine erste Vorstellung von der Relevanz ER-Stress-induzierter Mechanismen in inflammatorischen neutrophilen Granulozyten zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsartikel und Zubehör

| | |
|---|--------------------------------------|
| 96 well Platte Microlon Lumitrac 600 weiß, | Greiner BioOne, Frickenhausen |
| 96 well Platte Microplates, <i>F-bottom</i> | Greiner BioOne, Frickenhausen |
| <i>Adhesive PCR Film</i> | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| BD Falcon™ 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol | BD Biosciences, Heidelberg |
| CELLSTAR® <i>Cell Culture Flask</i> , 250 ml, 75 cm ² , <i>red filter cap, sterile</i> | Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen |
| CELLSTAR® 24-Well <i>Cell Culture Plate, sterile, with lid</i> | Greiner BioOne, Frickenhausen |
| CELLSTAR® 48-Well <i>Cell Culture Plate, sterile, with lid</i> | Greiner BioOne, Frickenhausen |
| Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™ | Greiner BioOne, Frickenhausen |
| Invitrogen™ <i>Blotting Filter Paper</i> 2,5 mm, 7,5 x 8,4 cm | Life Technologies, Darmstadt |
| MicroAmp® <i>Splash Free 96-Well Base</i> (Applied Biosystems®) | Life Technologies, Darmstadt |
| Mini Protean® <i>Tetra Cell Casting Stand with Clamp Kit</i> | BioRad Laboratories, München |
| Nitrocellulose Membran, 0,45 µm | BioRad Laboratories, München |
| PCR <i>Soft Tubes</i> 0,2 ml, farblos, DNase-, RNase-free | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf |
| <i>Plate Sealers</i> , Dynatech Microtiter® System | Dynatech, Denkendorf |
| Standard 96 Well <i>PCR Plates</i> | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| TipOne® RPT (<i>low retention Tips</i>) | STARLAB, Hamburg |

3.1.2 Geräte

| | |
|--|------------------------------------|
| 7300 <i>Real-Time PCR System</i> (Applied Biosystems®) | Life Technologies, Darmstadt |
| ChemiDoc™ XRS <i>Gel imaging System Universal Hood II</i> 76S/07543 | BioRad Laboratories, München |
| FACSCalibur Durchflusszytometer | BD Biosciences, Heidelberg |
| Invitrogen™ <i>Novex Semi-Dry Blotter</i> | Life Technologies, Darmstadt |
| Mini Protean® <i>Tetra Cell</i> | BioRad Laboratories, München |
| Multiplattenlesegerät Perkin Elmer Victor3™ V <i>Multilabel Counter model 1420</i> | PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau |
| MyCycler™ <i>Thermal Cycler</i> | Biorad Laboratories, München |
| <i>PowerPac HC Power Supply</i> | BioRad Laboratories, München |
| Spektralphotometer BioPhotometer plus | Eppendorf, Hamburg |
| UP50H Ultraschallprozessor mit Sonotrode MS1 | Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow |

3.1.3 Chemikalien

| | |
|---|--|
| Acrylamid 30%/Bis Solution | BioRad Laboratories, München |
| All trans-Retinolsäure (ATRA) 25 mg/ml DMSO | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Ammoniumchlorid, ≥ 99,5 % | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Ammoniumpersulfat (APS) | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Bovine Serum Albumine (BSA) BSA Fraction V pH 7,0 | PAA, Cölbe |
| Bromphenolblau | Roth®, Karlsruhe |
| CellWASH | BD Biosciences, Heidelberg |
| Chloroform, ≥ 99,5 % | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Ethanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Glycin | Roth®, Karlsruhe |
| Glycerol | Roth®, Karlsruhe |
| Isopropanol 2-Propanol BioReagent, ≥ 99 % | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimi-dazolylcarbocyanin Iodid) | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) | Roth®, Karlsruhe |
| Methanol zur Analyse EMSURE®, ACS, ISO, Reag. Ph Eur | Merck KGaA, Darmstadt |
| Mercaptoethanol | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Milchpulver | Roth®, Karlsruhe |
| Na-deoxycholat | Roth®, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | VWR®, Darmstadt |
| N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Roth®, Karlsruhe |
| Nonidet-P40 | Biomol, Hamburg |
| Ponceau S | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Roti®-Mark WESTERN-Set (Proteinmarker und Antikörper) | Roth®, Karlsruhe |
| Staurosporin (STS) 25 mg/ml DMSO | Alexis Biochemicals, ELS AG, Lausen |
| PowerSYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) | Life Technologies, Darmstadt |
| Propidiumiodid ≥ 94 % (HPLC) | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Thapsigargin (TP) | EMD Chemicals, Merck KGaA, Darmstadt |
| tri-Natriumcitrat-Dihydrat ACS ISO Reag. Ph Eur | Merck KGaA, Darmstadt |
| TRI Reagent® RNA Isolation Reagent | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Trichloressigsäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| Tris(-hydroxymethylaminomethan) | Roth®, Karlsruhe |
| Tris Base | Merck KGaA Molecular Biology Grade Calbiochem® |
| Tris-HCL | ULTROL® Grade, Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt |
| Triton™ X-100 | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |

| | |
|--|---------------------------|
| Trypanblau | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Tunicamycin (TM) from streptomyces sp. | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |
| Tween 20 | SIGMA-ALDRICH®, Steinheim |

3.1.4 Lösungen

| | |
|---|----------------------------------|
| Aqua dest. | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| BD FACS™ BD FACS <i>Clean Solution</i> | BD Biosciences, Heidelberg |
| BD FACS™ BD FACS <i>Rinse Solution</i> | BD Biosciences, Heidelberg |
| BD FACSTFlow™ BD FACSTFlow <i>Sheath Fluid</i> | BD Biosciences, Heidelberg |
| Easycoll NaCl 0,9% B. Braun NaCl 0,9%-Spüllösung | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Dulbecco), PBS-Lösung w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | Biochrom AG, Berlin |
| <i>RNase/DNase-free water Molecular Biology Grade Wate</i> | 5PRIME, Hamburg |
| Easycoll, Dichte 1,124 g/ml | Biochrom AG, Berlin |

- Hypotonische PJ-Lösung
 - 50 µg/ml Propidiumiodid
 - 0,1 % Triton™
 - 0,1 % tri-Natriumcitrat-Dihydrat ACS ISO Reag. Ph Eur,
 - Ponceau S (dunkel bei RT aufzubewahren, kann mehrmals verwendet werden)
 - 0,1 % Ponceau S
 - 3 % Trichloressigsäure
1. *Tris buffered saline* (TBS)
 - i. 7,7 mM Tris (pH 7,5)
 - 150 mM NaCl

3.1.5 Puffer

- 4 x Laemmli-Puffer (Lagerung bei 4°C, 6 Monate)
 - 252 mM Tris-HCL (pH 6,8)
 - 40 % Glycerol
 - 8 % SDS
 - 0,01 % Bromphenolblau

- 4 x Sammelgelpuffer
 - 0,5 M Tris (pH 6,8)
 - 0,4 % SDS

- 4 x Trenngelpuffer
 - 1,5 M Tris (pH 8,8)
 - 0,4 % SDS

- *Blotting*-Puffer
 - 40 ml 25 x Transferpuffer
 - 50 ml Methanol
 - Ad 500 ml aqua dest.

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

- Lysepuffer (Lagerung bei 4°C unbegrenzt)
 - 0,83 % Ammoniumchlorid
 - 0,1 % KHCO₃
 - 0,004 % EDTA

- RIPA Puffer
 - 50 mM Tris pH=8
 - 150 mM NaCl
 - 1 % Nonidet-P40
 - 0,5 % Na-deoxycholat
 - 0,1 % SDS

- *Stripping*-Puffer
 - 62,5 mM Tris (pH 6,8)
 - 2 % SDS

- *Tris-Glycine* Transferpuffer (6 Monate bei RT haltbar)
 - 12 mM Tris Base
 - 96 mM Glycin
 -

3.1.6 Zellkulturmedien

| | |
|--|------------------------------|
| Fetales Kälberserum (FCS) <i>Fetal Bovine Serum</i> Gold | PAA, Cölbe |
| Penicillin/Streptomycin (PS) Gibco® Penicillin/Streptomycin 100X Solution | Life Technologies, Darmstadt |
| RPMI-1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, 2,0 g/l NaHCO ₃ | Biochrom AG, Berlin |

3.1.7 Kits

| | |
|---|---|
| AMERSHAM ECL <i>WESTERN BLOTTING SYSTEM</i> | GE Healthcare, Freiburg |
| Caspase-Glo™ 3/7 <i>Assay System</i> | Promega GmbH, Mannheim |
| Caspase-Glo™ 9 <i>Assay System</i> | Promega GmbH, Mannheim |
| DNA-free™ Kit ambion® (Invitrogen™) | Life Technologies, Darmstadt |
| ECL <i>Western Blotting Substrate</i> | Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL USA |
| Omniscript RT Kit (200) | Qiagen, Hilden |
| Pierce BCA Protein <i>Assay Kit</i> | Thermo Scientific, Rockford, IL USA |
| <i>Protease Inhibitor Cocktail Complete</i> , Mini (1 Tablette/10 ml RIPA, 1 ml Aliquots) | Roche, Mannheim |
| <i>Random Octamers</i> 100 µM | Jena Bioscience, Jena |
| RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl) | Thermo Scientific, Rockford, IL USA |

3.1.8 Oligonukleotide

- Oligo-dT15 5'- TTTTTTTTTTTTTTTT ; SIGMA-ALDRICH®, Steinheim
- *Primer* (SIGMA-ALDRICH®, Steinheim)
 - 18s
 - Forward 5'- CAT GGT GAC CAC GGG TGA C -3'
 - Reverse 5'- TTC CTT GGA TGT GGT AGC CG -3'
 - Bim
 - Forward 5'- AGT GGG TAT TTC TCT TTT GAC ACA G -3'
 - Reverse 5'- GTC TCC AAT ACG CCG CAA CT -3'
 - Bip
 - Forward 5'- AGC CTG GCA CAA GAG -3'
 - Reverse 5'- TCC TTG GGC AGT ATT GGA TT

- Chop
 - Forward 5' - AGC TGG AAC CTG AGG AGG AGA GA -3'
 - Reverse 5' - TGG ATC AGT CTG GAA AAG -3'

3.1.9 Antikörper

Primärantikörper

| | |
|---|---|
| BD Pharmingen™ <i>Purified Mouse Anti-Human MCL-1 #559027</i> | BD Biosciences, Heidelberg |
| <i>Bip Antibody #3183, rabbit polyclonal antibody</i> | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main |
| <i>Caspase-4 Antibody, rabbit polyclonal antibody</i> | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main |
| <i>Chop (L63F7) #2895, mouse monoclonal antibody</i> | Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main |
| <i>GADD 153 (B-3): sc-7351, mouse monoclonal antibody</i> | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg |
| <i>GRP 78 (H-129): sc-13968, rabbit polyclonal antibody</i> | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg |

Sekundärantikörper

| | |
|---|--------------------------------|
| <i>Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP #P0447</i> | Dako Deutschland GmbH, Hamburg |
| <i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP #P0448</i> | Dako Deutschland GmbH, Hamburg |

3.2 Methoden

3.2.1 Probanden

Zwischen 02/12 und 07/13 wurden im Rahmen dieser Arbeit gesunde Probanden auf freiwilliger Basis als Spender für PMN rekrutiert. In diesem Zeitraum stellten sich insgesamt 20 individuelle Spender teilweise mehrfach zur Verfügung. Die Geschlechterverteilung betrug w 13 : 7 m. Keiner der Probanden wies zum Zeitpunkt der Probenentnahmen oder sonst bekannte immunologische Besonderheiten auf. Die Probenentnahme wurde nur bei subjektivem Gesundheitsgefühl und fehlenden Entzündungszeichen durchgeführt.

Zur Untersuchung der ER-Stress abhängigen Apoptoserate in PMN polytraumatisierter Patienten wurden in Kooperation mit den behandelnden Ärzten der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des UKD Blutproben von Patienten mit Z.n Polytrauma gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte auf der Intensivstation an Tag 1, Tag 5 und Tag 10 nach dem Ereignis. Patienten wurden in die Untersuchung eingeschlossen wenn das Verletzungsmuster der

Definition eines Polytraumas entsprach. Weitere Voraussetzungen waren die Volljährigkeit und das Einverständnis der Patienten. Im Zeitraum dieser Arbeit konnten von insgesamt 5 Patienten alle erforderlichen Proben gewonnen und ausgewertet werden. (Für die Verwendung von biologischem Material und die Arbeit mit Patienten im Rahmen dieser Dissertation liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität vor; Studiennummer 3412.)

3.2.2 Auftauen und Kultivierung von HL-60 Zellen

HL-60 Zellen (*human promyelocytic leukemia cells*) wurden 1976 aus dem peripheren Blut einer damals 36-jährigen Patientin mit akuter myeloider Leukämie isoliert. Sie erfreuen sich aufgrund ihrer Eigenschaften großer Beliebtheit bei der Erforschung der Proliferation und Differenzierung der myeloiden Zellreihe. HL-60 Zellen proliferieren in Zellkultur wachstumsfaktorunabhängig und unbegrenzt, und verfügen trotz ihres malignen Wachstumspotentials über die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung entlang der myeloiden Zellreihe. Die Bipotenz der HL-60 Zelle sich u.a. sowohl in Granulozyten-ähnliche als auch in Makrophagen-ähnliche Zellen zu differenzieren bedeutet, dass es sich um Zellen mit den Eigenschaften der GM-CSC (*Granulocyte-makrophage colony-forming cells*) handelt. Die Erkenntnis, dass sich *in vitro* und *in vivo* leukämische Promyelozyten mit *all-trans* Retinolsäure (ATRA) in reife Granulozyten ausdifferenzieren lassen, und die konsekutive Anwendung von ATRA ab 1986 in der Therapie der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) ist einer der Meilensteine bei der Arbeit mit HL-60 Zellen. Für diese Arbeit wurden HL-60 Zellen von Passage 10 bis Passage 22 verwendet. Die Erhaltung der Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium + 10 % FCS, Medienwechsel alle 3-4 Tage.

HL-60 Zellen wurden zu je 2×10^6 Aliquots in 90 % FCS + 10 % DMSO bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die Einfrierröhrchen im Wasserbad zügig aufgetaut, sodass ein großer Teil des Mediums flüssig war, die Zellsuspension aber noch kalt blieb, damit es nicht zu einer Reaktion der Zellen mit DMSO kam. Daraufhin wurde die Zellsuspension zügig in ein Falcon mit 10 ml RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) überführt. Anschließend wurde die verbliebene, noch gefrorene Zellsuspension in etwas Medium aufgetaut, ebenfalls in das Falcon überführt und 5 min bei $470 \times g$ abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PS ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) aufgenommen, in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank kultiviert. Alle 3-4 Tage erfolgte das *Splitten* der Kultur mit einem Medienwechsel. Hierfür wurden bis auf einen kleinen Rest alle Zellen

abgesaugt und die verbleibenden Zellen in 20 ml vorgewärmtem RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PS resuspendiert.

3.2.3 Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen mittels ATRA

Um HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren, wurden HL-60 Zellen ab Passage zehn für fünf Tage mit ATRA behandelt. Jeweils 2×10^6 HL-60 Zellen in 20 ml warmem RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PS wurden in T75 Zellkulturflaschen ausgesäht. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 1 μ M ATRA (Stammlösung 25 mg/ml DMSO). Eine Flasche diente als Kontrolle und wurde unbehandelt belassen. Nach fünf Tagen (120 Std.) wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

3.2.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme zur Gewinnung von PMN erfolgte jeweils im unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang mit geplanten Versuchsansätzen und wurde mit dem BD Vacutainer® System zur venösen Blutentnahme durchgeführt:

- BD Vacutainer® Safety-Lok™ Sicherheitsblutentnahmeset und Halter
- BD Vacutainer® Plasmaröhrchen 6 ml, mit sprühgetrocknetem Na-Heparin Zusatz.

In der Annahme, dass sich aus einem 6 ml Heparin-Röhrchen durchschnittlich 10×10^6 PMN isolieren lassen, wurde die Anzahl der abzunehmenden Röhrchen an der für die geplanten Versuche benötigte Zellzahl bemessen.

Die Auswahl der Probanden erfolgte nach Bereitschaft, Verfügbarkeit und Abwesenheit von systemischen Entzündungszeichen.

3.2.5 Herstellung einer reinen Granulozyten-Population

Das entnommene heparinisierte Vollblut wurde umgehend einer Dichtegradienten-Isolation zugeführt, um eine möglichst reine Granulozyten-Population zu erhalten. Zunächst wurde in einem 15 ml Falcon 5 ml Easycoll mit 3,4 ml NaCl 0,9 % verdünnt. Hierdurch erreicht man die zur Isolation von Granulozyten optimierte spezifische Dichte des Gradienten von 1,086. Auf den Gradienten wurde langsam das Vollblut aus je einem Heparinröhrchen (ca. 5 ml) aufgeschichtet. Dabei wurde beachtet, dass es nicht zu einer Vermischung von Blut und Gradient kam. Die Proben wurden bei RT für 25 min und $840 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert (Gesamtdauer ca. 45 min). Gemäß der unterschiedlichen Dichte verschiedener Zellarten

kommt es zu einer Auftrennung der Zellarten entlang des Dichtegradienten, wobei mononukleäre Zellen eher im mittleren Segment verbleiben, wohingegen Granulozyten den Gradienten komplett durchwandern und mit den Erythrozyten im Zellpellet zu liegen kommen. Die unterschiedliche Schichtung von Dichtegradient und Blutbestandteilen vor und nach der Zentrifugation ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

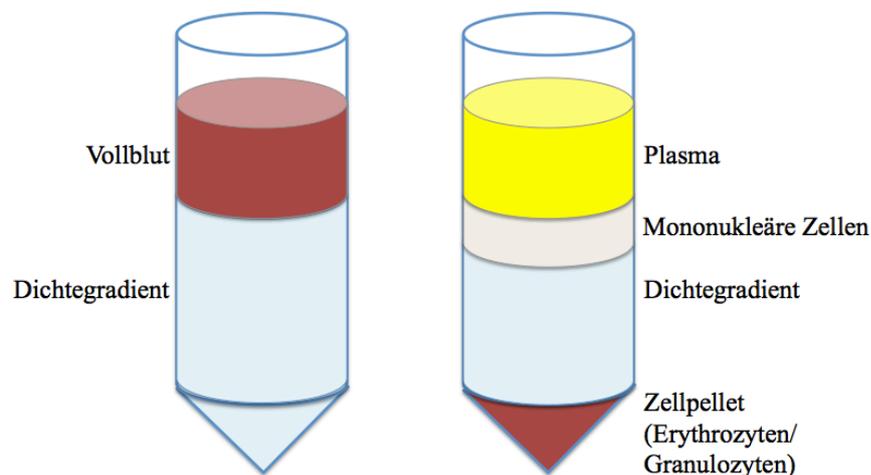


Abb. 1: Schematische Darstellung der Verteilungsverhältnisse im Rahmen der PMN-Isolation vor (links) und nach der Zentrifugation (rechts).

Der Überstand über dem Zellpellet wurde entfernt und verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer vorsichtig resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt, welches mit Lysepuffer aufgefüllt wurde. Die Lösung wurde für 10 min auf Eis inkubiert, bis das Lysat klar wurde. Durch diesen Schritt wurden die Erythrozyten aus dem Zellpellet entfernt. Anschließend wurden die verbliebenen PMN für 5 min bei 470 x g abzentrifugiert und der Überstand über dem Zellpellet dekantiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in PBS resuspendiert und einmal in 50 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in PBS wurden die Zellen gezählt und unmittelbar im Anschluss in RPMI 1640 + 5 % FCS + 1 % PS aufgenommen und in einen Versuch eingesetzt.

3.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Um eine konstante Zahl vitaler Zellen einzusetzen und somit die Vergleichbarkeit der Versuchsansätze zu gewährleisten, wurden die gewonnenen, in Suspension vorliegenden PMN oder HL-60 Zellen mit Hilfe der Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität untersucht und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Hierfür wurden 20 µl Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt und kurz gevortext. Gleichzeitig wurde die Zählkammer vorbereitet,

indem das Deckglas vorsichtig auf die Grundplatte geschoben wurde, wobei die Entstehung der sog. Newtonschen Interferenzfarben genau beachtet wurde, da diese als Maß für die richtige Einstellung des Abstandes zwischen Kammerboden und Deckglas gelten (0,1 mm). Bei schrägem Ansetzen der Pipette mit der Zellsuspension am Deckglas breitet sich die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammerboden in einem genau definierten Volumen aus. In der Lichtmikroskopie wurden die gelösten Zellen zunächst nach ihrer Vitalität beurteilt, wobei sich vitale Zellen mit intakter Zellmembran weiß darstellen, während avitale Zellen durch die Aufnahme von Trypanblau blau erscheinen. Im nächsten Schritt wurden die vitalen Zellen in vier großen Eckquadraten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Aus diesem Mittelwert mit dem Faktor 10 ergibt sich die Zellzahl/ μl Suspension, da ein Eckquadrat eine Grundfläche von 1 mm^2 hat ($1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$). Unter Berücksichtigung der Verdünnung der Zelloösung mit Trypanblau ergibt sich die Zelldichte wie folgt:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = \text{MW(aus vier Eckquadraten)} \times 2 \times 10^4$$

3.2.7 Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung einzelner Zellen und ggf. deren Sortierung. Kriterium der Charakterisierung sind die optischen Signale, die jede einzelne Zelle bei der Passage eines Lasers emittiert. Die Art der optischen Signale ist dabei abhängig von Zelleigenschaften wie Zellvolumen, Granularität oder Zellkernstruktur. Durch gezielte Vorbehandlung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen können spezifische Zelleigenschaften wie DNA-Gehalt oder Oberflächenproteine untersucht werden. Voraussetzung für die Durchflusszytometrie ist, dass die zu untersuchenden Zellen in Suspension vorliegen. Aus der Probe werden die Zellen dann in die Trägerflüssigkeit aufgenommen und, fixiert durch den sog. Hüllstrom, durch die Messküvette geführt. Hier passieren die Zellen einzeln den Laserstrahl. Das dabei entstehende Streulicht wird an zwei Stellen detektiert und elektronisch umgewandelt, sodass die Informationen gespeichert werden können. Der *Forward scatter detector* (FSC) erfasst das Vorwärtsstreulicht entlang der Achse des einfallenden Lichtes. Hierbei gibt die Beugung des Lichts an der Zelloberfläche Aufschluss über die Zellgröße. Der *Side scatter detector* (SSC) misst das Seitwärtsstreulicht in einem Winkel von 90° . Es repräsentiert die Lichtbrechung an zellulären Strukturen und ist ein Maß für die Komplexität

des Zellinneren. In Abb. 2 sind das Prinzip der Durchflusszytometrie und die entsprechenden Lichtwege im FACSCalibur Durchflusszytometer schematisch dargestellt.

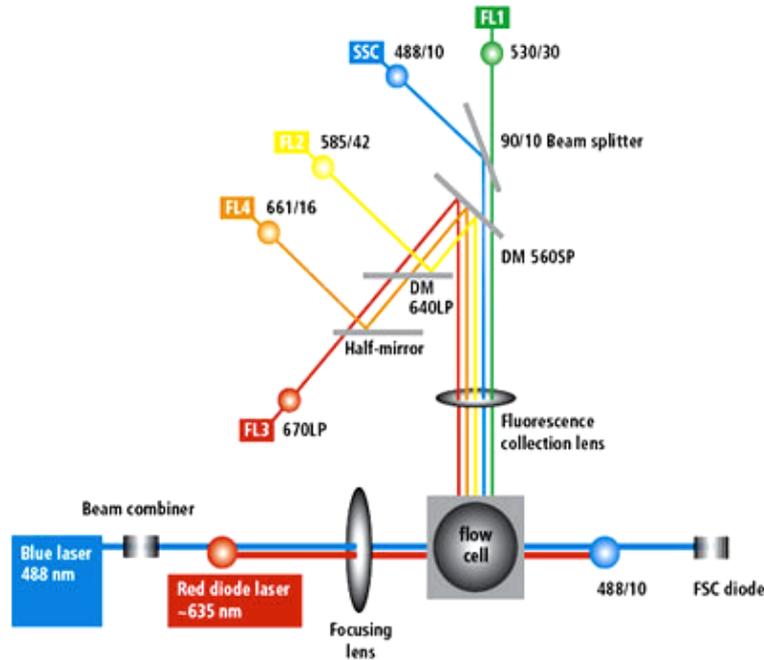


Abb. 2 : FACSCalibur, optischer Pfad.

Schematische Darstellung der Lichtwege und Messpunkte des FACSCalibur Durchflusszytometers.

Mit freundlicher Genehmigung von Becton Dickinson GmbH/Eigentum der Becton Dickinson GmbH (88).

Die Fluoreszenzmessung macht sich die Eigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe wie Propidiumiodid (PJ) zunutze Lichtenergie einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (charakteristisches Absorptionsspektrum) und mit einer niedrigeren Wellenlänge wieder zu emittieren (charakteristisches Emissionsspektrum). Dieser Effekt beruht darauf, dass bei der Absorption ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben wird und beim Zurückfallen ein Photon emittiert (=Fluoreszenz). Auch die Fluoreszenz wird durch mehrere Detektoren erfasst (FL-1 bis FL-4). PJ ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator. Nach Interkalation in die DNA hat PJ ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm (Detektion am FL-2 h Detektor). Mittels PJ wurde in dieser Arbeit die Apoptoserate am Durchflusszytometer nach der Methode von Nicoletti et al. untersucht. Hierbei werden die Zellen in einer Triton X-haltigen hypotonischen PJ-Lösung lysiert, wobei die Kernmembran erhalten bleibt und PJ die DNA interkaliert. Kerne apoptotischer Zellen enthalten durch DNA-Fragmentation (ein spätes Apoptosezeichen) kleinere DNA-Fragmente, fluoreszieren somit schwächer und erscheinen daher im Histogramm unterhalb des sog. G1-Peaks, der hingegen vitale Zellen mit haploidem Chromosomensatz repräsentiert. Der Sub-G1-Anteil der Zellen wurde als prozentuale Apoptoserate der gemessenen Probe gewertet. Zur Bestimmung

der prozentualen Apoptoserate in PMN und HL-60 nach Inkubation mit ER-Stress-Induktoren wurden nach Ablauf von 18 h jeweils 100 µl Zellsuspension aus den entsprechenden Wells entnommen, in FACS-Röhrchen überführt, bei 470 x g für 5 min abzentrifugiert und in 250 µl hypotonischer Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h lichtgeschützt bei 4°C erfolgte die Durchflusszytometrie am FACS-Gerät (FACSCalibur, BD). Die Dokumentation und Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Datenverarbeitungssoftware BD *CellQuestPro*[™]. Aus jeder Probe wurden mindestens 10000 „events“ bestimmt. Aus allen erfassten Zellen wurde die Granulozytenpopulation im *Dot-Plot* anhand von SSC und FSC in einem linearen Koordinatensystem visuell bestimmt und mittels „gating“ zur Analyse ausgewählt. Die Bestimmung der prozentualen Apoptoserate innerhalb der ausgewählten Zellpopulation gelang im Histogramm. Anhand der logarithmisch auf der x-Achse aufgetragenen Fluoreszenzwerte am FL2-H Detektor lässt sich der Anteil der Zellen in der Sub-G1 Phase des Zellzyklus visuell-manuell eingrenzen (M1). Das initial ausgewählte „gate“ sowie der Messbereich M1 wurden innerhalb einer Probenmessung beibehalten. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 3 ein repräsentativer *Dot-Plot* und ein repräsentatives Histogramm einer Kontrollmessung dargestellt.

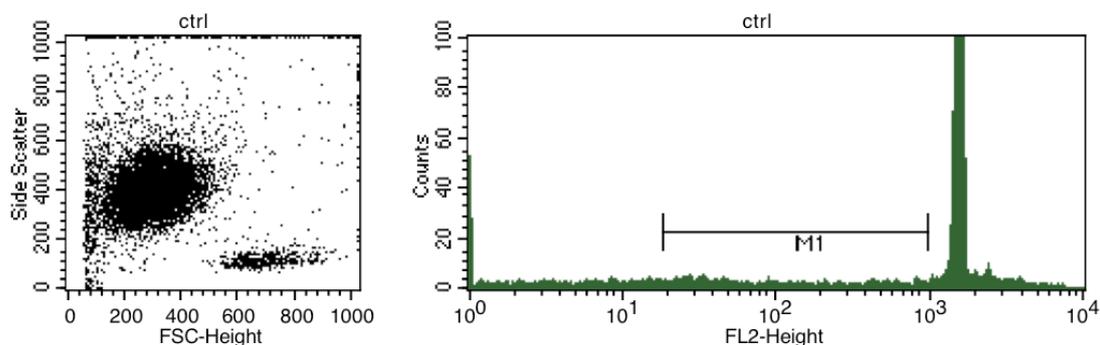


Abb. 3: Repräsentativer *Dot-Plot* und Histogramm für PMN nach 18 h Zellkultur (Kontrolle). Die zu untersuchende Granulozytenpopulation stellt sich im *Dot-Plot* als Punktwolke zwischen SSC- und FSC-Werten dar. M1 wurde anhand des FL2-H-Wertes unterhalb des G1-Peak festgesetzt. Eine Zunahme gemessener „events“ in M1 im Vergleich zur Kontrolle entspricht einer Zunahme der Apoptoserate.

3.2.8 RNA Isolation mittels Trizol

Um aus den in den Versuchsansätzen gewonnen Zellpellets die enthaltene RNA zu extrahieren, wurde die Methode nach Chomczynski und Sacchi angewandt, bei der die Zellen zunächst lysiert, die RNA mittels Phasentrennung isoliert und dann präzipitiert wird. Für die RNA-Isolation in dieser Arbeit wurde zunächst jeder Probe 1 ml Trizol zugesetzt, vorsichtig

auf und ab pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das im Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat führt zu Zellyse und inaktiviert verschiedene Enzyme, u.a. RNase, was den RNA Verdau in der Probe verhindert. Im nächsten Schritt wurden je 200 μ l Chloroform zugesetzt, die Proben kräftig gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. In diesem Schritt beginnt die Phasentrennung in wässrige Phase, Interphase und organische Phase, die durch Zentrifugation bei 12 100 x g bei 4°C abgeschlossen wurde. Abb. 4 gibt die Phasentrennung nach der Zentrifugation schematisch wieder.

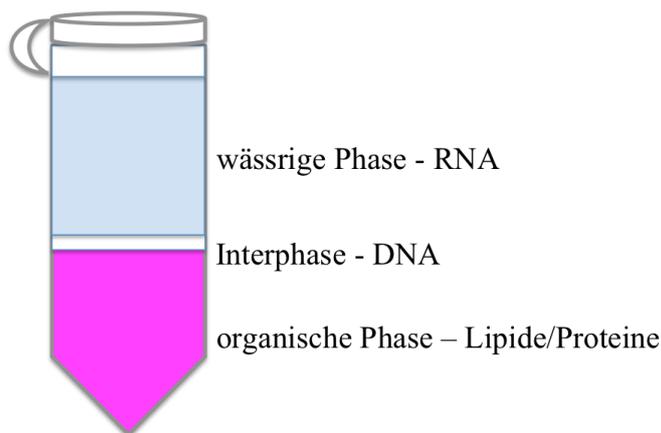


Abb. 4: Schematische Darstellung der Phasentrennung im Rahmen der RNA-Isolation.

Die wässrige RNA-Phase wurde möglichst genau abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurde die RNA aus der wässrigen Phase ausgefällt. Dazu wurde jeder Probe 500 μ l Isopropanol zugesetzt und kräftig gevortext. Nach 10 min Inkubation bei RT folgte die Zentrifugation für 10 min bei 11 200 x g bei 4°C. Nach diesem Schritt sammelt sich die präzipitierte RNA in einem Pellet. Der Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und das Pellet zwei Mal in 1 ml 75 % EtOH gewaschen und bei 6300 x g bei 4°C abzentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des EtOH wurde der Überstand erneut möglichst genau abgenommen und die Reaktionsgefäße für 10 min zum abdampfen offen unter den Abzug gestellt. Danach erfolgte die Resuspension in RNase-freiem Wasser (10-50 μ l).

3.2.9 RNA-Aufreinigung

Vor der weiteren Verwendung wurde die RNA mittels des DNA-free™ Kit; ambion® aufgereinigt. 50 μ l Probe wurden jeweils mit 5 μ l Puffer und 2,5 μ l DNase aus dem DNA-free™ Kit versetzt, gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut gevortext und

weitere 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Im nächsten Schritt wurden jeder Probe 5 µl DNase-Inactivating Reagent aus demselben Kit zugesetzt, kräftig gevortext und die Proben für 2 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand, sprich die aufgereinigte RNA, abgenommen und in saubere Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.10 RNA-Konzentrationsbestimmung

Um die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben und somit der *Real-Time* PCR zugänglich zu machen, ist es erforderlich, die genaue RNA-Konzentration in jeder einzelnen Probe zu bestimmen. Für diese Arbeit wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurde aus jeder Probe eine Verdünnung mit 10 mM Tris-HCL (pH 7,6) 1:25 in einem Gesamtvolumen von 52 µl hergestellt. Anschließend wurde die Absorption jeder Probe bei 260 nm bestimmt, da in diesem Wellenlängenbereich eine lineare Beziehung zwischen Nukleinsäurekonzentration und Absorption besteht.

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich dann die RNA-Konzentration jeder Probe berechnen:

$$c = E_{260} \times f \times n$$

Wobei gilt:

- c = Konzentration in µg/µl
- E = Extinktion
- F = Verdünnungsfaktor
- n = Nukleinsäurespezifischer Faktor (40 µg/ml)

Die Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) wird zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Probe herangezogen. Dabei sollte der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm 1,8 nicht unterschreiten.

3.2.11 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Entsprechend dem durchschnittlichen RNA-Gehalt der Proben wurde jeweils eine konstante Menge RNA (400 ng aus HL-60; 200 ng aus PMN) umgeschrieben. Dazu wurde eine Probenverdünnung in RNase-freiem Wasser mit 40 bzw. 20 ng/µl hergestellt, und

jeweils 10 µl der Verdünnung in einem PCR *Soft Tube* (0,2 ml) auf Eis vorgelegt. Nach folgendem Schema wurde der *Mastermix* pro Probenansatz in der benötigten Gesamtmenge hergestellt:

| | |
|----------------------------------|---------|
| 10 x RT-Puffer | 2 µl |
| d-NTP (5 mM) | 2 µl |
| Oligo dT (20 µM) | 1 µl |
| RNase-Inhibitor | 0,25 µl |
| Omniskript Reverse Transkriptase | 0,25 µl |
| <i>Random Octamers</i> (100 µM) | 2 µl |
| RNase-freies Wasser | 2,5 µl |
| Gesamtmenge | 10 µl |

Anschließend wurde jeder Probe 10 µl *Mastermix* zugesetzt und der Transkriptionsprozess im Blockcycler (BioRad) für eine Stunde gestartet. Die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf des Programms wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und entweder sofort in der *Real-Time* PCR verwendet oder bei -20°C zur späteren Verarbeitung gelagert.

3.2.12 *Real-Time quantitative* PCR (qPCR)

Mit Hilfe der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) lassen sich Nukleinsäuren selektiv amplifizieren und somit analysieren. Dabei wird die zu untersuchende DNA bei 94°C denaturiert, bei 60°C an beiden Einzelsträngen mit einer komplementären Nukleinsäuresequenz, dem sogenannten *Primer*, markiert und durch eine thermostabile DNA-Polymerase repliziert. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden. Jeder Zyklus resultiert dabei in einer Verdopplung der Anzahl der vorliegenden DNA-Kopien. Die Zunahme der DNA-Menge verhält sich somit unter optimalen Reaktionsbedingungen exponentiell. Die qPCR basiert auf dem Prinzip der PCR, bietet aber zusätzlich den Vorteil, dass die amplifizierte DNA im gleichen Ansatz auch quantifiziert werden kann. Dieser Effekt basiert z. B. auf der Anwendung von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR *Green*. In der Annahme, dass das messbare Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der vorhandenen PCR-Produkte zunimmt, kann von den erfassten Fluoreszenzsignalen in der exponentiellen Phase der PCR auf die Quantität der PCR-Produkte rückgeschlossen werden. Für die qPCR in dieser Arbeit wurde zunächst für jedes zu untersuchende Gen 2 ng – 10 ng

cDNA (4 µl Volumen) als Triplet auf einer 96-Well Platte vorgelegt. Zur relativen Quantifizierung der nachzuweisenden Genregulation wurde parallel die Expression des *housekeeping*-Gens 18 S untersucht, welches sich durch seine konstitutive Expression auszeichnet, bzw. keiner Regulation durch äußere Einflüsse auf die Zelle unterliegt. Zum Ausschluss von Kontamination der Platte oder des Probenansatzes wurde für jedes untersuchte Gen auf jeder Platte eine *no-template-control* (NTC) durchgeführt.

Optimale cDNA-Menge für jedes untersuchte Gen (ng/4µl):

| | PMN | HL-60 |
|------|-----|-------|
| 18 s | 2 | 2 |
| Chop | 10 | 2 |
| Bip | 4 | 4 |
| Bim | 2 | 4 |

Reaktionsansatz für qPCR (je nach *Primer*):

| | |
|-----------------------------|---------|
| <i>PowerSYBR®Green 2 x</i> | 12,5 µl |
| <i>Primer Forward 10 µM</i> | 0,25 µl |
| <i>Primer Reverse 10 µM</i> | 0,25 µl |
| H ₂ O | 7 µl |
| <i>Sample</i> | 4 µl |

| | |
|-----------------------------|---------|
| <i>PowerSYBR®Green 2 x</i> | 12,5 µl |
| <i>Primer Forward 10 µM</i> | 0,75 µl |
| <i>Primer Reverse 10 µM</i> | 0,75 µl |
| H ₂ O | 8 µl |
| <i>Sample</i> | 4 µl |

Die Durchführung der qPCR sowie die Dokumentation und Auswertung der Daten erfolgte mit dem *Applied Biosystems Real-Time PCR System (7300 Real Time PCR System)*. Für jeden qPCR-Lauf galten die folgenden Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1: 10 min 95°C (Enzymaktivierung)
- Schritt 2: 40 Zyklen
- 15 sec 95°C (Denaturierung)
 - 60 sec 60°C (*Primer Annealing* und Elongation)

3.2.13 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zellpellets wurden zunächst in je 30 µl RIPA-Puffer + Proteaseinhibitor (*Complete Mini*, Roche) aufgenommen. Anschließend wurde jede Probe mit 10-15 Stößen sonifiziert (UP50H Ultraschallprozessor mit Sonotrode MS1, Hielscher Ultrasonics). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits durchgeführt. Diese Methode beruht auf zwei Reaktionen, die in einem Farbumschlag resultieren der wiederum photometrisch gemessen werden kann (Prinzip der Kolometrie). Der BCA *Working Reagent* enthält u.a. 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure, BCA) und Cu²⁺-Ionen in alkalischem Milieu. In Gegenwart von Proteinen bilden deren Peptidbindungen in konstanter Weise Chelatkomplexe mit den Cu²⁺-Ionen, wobei diese zu Cu⁺-Ionen reduziert werden (sog. Biuret-Reaktion). Diese Reaktion ist temperaturabhängig. In einer weiteren Reaktion bilden je zwei BCA-Moleküle mit einem Cu⁺-Ion einen Chelatkomplex violetter Farbe mit nahezu linearer Absorption bei 562 nm. Die Proben wurden zunächst 1:6 mit PBS verdünnt und als Duplet zu je 10 µl auf eine 96-Well Platte pipettiert. Zusätzlich wurde ein BSA-Standard ebenfalls in 10 µl-Duplets (0 bis 2 µg/µl) verwendet. Es wurde jedem Well 200 µl BCR Working Reagent zugesetzt und die Platte 30 min bei 37 °C inkubiert. Sobald die Platte auf RT abgekühlt war, erfolgte die Quantifizierung des Farbumschlags durch die photometrische Messung der Absorption bei 562 nm (Victor3TM, PerkinElmer). Aus den Absorptionswerten wurden die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

3.2.14 Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein Verfahren zu Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Ladung in einem elektrischen Feld. Dabei dient ein Polyacrylamid-Gel variabel einstellbarer Porengröße als molekularer Filter. Das Gel ist diskontinuierlich, das heißt, es besteht aus einem Sammelgelanteil, in dem sich Geltaschen für die Proben befinden und einem Trenngelanteil, in dem die eigentliche Auftrennung passiert. Nach spezifischer Aufbereitung des zu untersuchenden Proteingemisches (s.u.) weisen alle Proteine eine gleichmäßige negative

Ladung auf. Entlang der angelegten Spannung können die Proteine dann das Gel Richtung Anode durchwandern und kommen an einem für ihre spezifische Größe und Ladung charakteristischen Ort zu liegen.

Für die Gelelektrophoresen in dieser Arbeit wurden 10 %ige Polyacrylamid-Gele, 1 mm dick, mit der Mini Protean® Gelgießapparatur von BioRad wie folgt hergestellt:

| Trenngel 10 % | | Sammelgel 4 % | |
|--------------------|----------|---------------------|---------|
| Acrylamid 30 % | 2,5 ml | Acrylamid 30 % | 650 µl |
| Aqua dest. | 3,125 ml | Aqua dest. | 3 ml |
| 4 x Trenngelpuffer | 1,875 ml | 4 x Sammelgelpuffer | 1,25 ml |
| TEMED | 10 µl | TEMED | 10 µl |
| APS | 25 µl | APS | 25 µl |

Die Zugabe von APS katalysiert die Polymerisation von Acrylamid und erfolgte daher als letztes. Unmittelbar danach wurde das Gemisch zwischen die mit Ethanol gereinigten Glasplatten in der Apparatur gegossen und mit Ethanol überschichtet, um ein Austrocknen des oberen Trenngelabschlusses zu vermeiden. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel in gleicher Weise aufgeschichtet, wobei hier Käbme zur Bildung von zehn Taschen eingesetzt wurden. Für einen Gellauf wurden die Proteine in folgender Weise aufbereitet: Vorlage von 40 µg Protein in Aqua dest. in einem Gesamtvolumen von 18 µl in einem 1,5 µl Reaktionsgefäß. Danach erfolgte die Zugabe von 6 µl 4 × Laemmli Puffer, versetzt mit 20 % Mercaptoethanol zu jeder Probe und Aufkochen bei 95°C für 8 min. Mercaptoethanol, ein reduzierendes Thiol, bricht die Disulfidbrücken der Proteine. Die Hitze bricht die Wasserstoffbrückenbindungen und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Das im Laemmli-Puffer im Überschuss vorhandene SDS, ein anionisches Tensid, bindet in konstanter Weise (1,4 g SDS/g Protein) über hydrophobe Wechselwirkungen an die denaturierten Proteine und überdeckt deren Eigenladung. Die hieraus resultierende gleichmäßige negative Ladung und kettenartige Streckung aller Proteine in der Probe schafft ideale Voraussetzungen für die Gelelektrophorese. Diese erfolgte in einem Tris-Glycin Puffersystem in der Mini Protean® Tetra Cell von BioRad. Nach dem Auftragen erfolgte die Sammlung der Proben im Sammelgel bei 60 V und die Auftrennung im Trenngel bei 120 V. Als Molekulargewichtsstandard wurde das Roti®-Mark Western-Set verwendet. Nachdem die Proben das Gel vollständig durchlaufen hatten, wurden die Gele sofort in 2 x Tris-Glycin Transferpuffer überführt, Sammel- und Trenngel getrennt und die Trenngele im Western Blot weiterverarbeitet.

3.2.15 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Übertragung von in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran mittels Elektrophorese. Hierbei wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt. Daraufhin wandern die aufgetrennten, negativ geladenen Proteine aus dem Gel Richtung Anode auf die Membran, ohne dass das Auftrennungsmuster verändert wird. Abb. 5 stellt schematisch die Anordnung von Gel, Membran, *Blotting*-Papier und angelegter Spannung im *Blotting*-System dar.

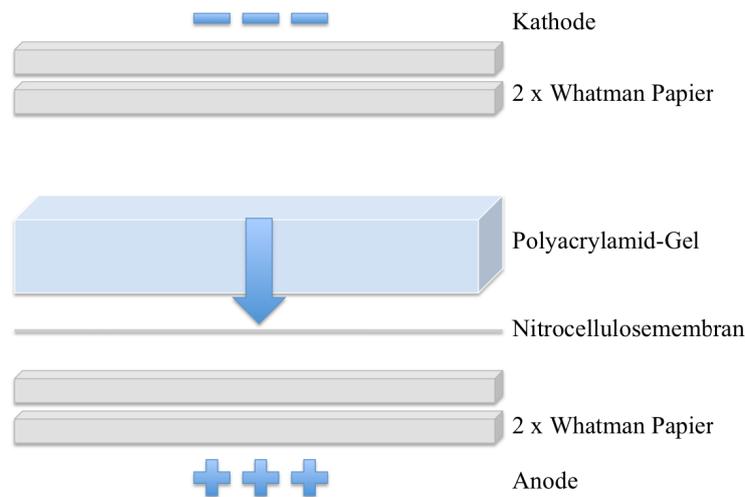


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Blotting Systems.

Das Blotten erfolgte mit einem Tris-Glycine Transferpuffersystem im *Semi-Dry* Verfahren (PowerPac HC Power Supply, BioRad), wobei die Adsorption der Proteine an einer Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 μm) auf ionischen und polaren Wechselwirkungen basiert. Das Whatmanpapier wurde mit Transferpuffer getränkt, die Membran in Transferpuffer aktiviert und der oben gezeigte Schichtaufbau, unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen, in der Blotting-Kammer gewählt. Die Kammer wurde mit mäßigem Druck gleichmäßig verschraubt und für 1,5 h mit 23 V an den *Power Supply* von BioRad angeschlossen. Direkt im Anschluss wurde der Blot abgebaut und die Membranen zum Nachweis der erfolgreichen Proteinübertragung für ca. 5 min in Ponceau S gefärbt. Durch schrittweises Entfärben in Aqua dest. ließen sich die Proteinbanden beurteilen und anhand des Molekulargewichtsstandards zuordnen. Nach vollständigem Entfärben wurden die Membranen in PBS bei 4°C zur späteren Immunmarkierung gelagert.

3.2.16 Immundetektion

Die Immundetektion erlaubt den Nachweis einzelner Proteine auf einer Membran. Zu diesem Zweck wird die Membran mit einem monoklonalen (*mouse*) oder polyklonalen (*rabbit*) Antikörper inkubiert, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. In einem zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des monoklonalen oder polyklonalen Erstantikörpers bindet (Immunkonjugat) und ein Enzym (HRP = *horseradish peroxidase*) gebunden hat. HRP katalysiert die Oxidation des in der Entwicklerlösung enthaltenen Luminols (3-Amino-Phthalsäurehydrazid), wobei eine detektierbare elektromagnetische Strahlung (Chemolumineszenz) entsteht. Für die Immundetektion von Proteinen in dieser Arbeit wurde die Nitrocellulosemembran zunächst gemäß der Herstellerangaben für den verwendeten Primärantikörper für 1 h bei RT in 5 ml 5 % BSA oder 5 % Milchpulver in TBS-T (Blocklösung) in einem 50 ml Falcon inkubiert. Dieses sogenannte „Blocken“ minimiert die unspezifische Bindung von Antikörpern. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Membran mit dem proteinspezifischen Primärantikörper für Chop, Bip, Caspase-4 und MCL-1 ebenfalls streng nach Herstellerangaben verdünnt in 5 % BSA oder 5 % Milchpulver in TBS-T. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran im Falcon 3 x 5 min in je 15 ml TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (*Polyclonal Goat Anti-Mouse/Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP #P0447/#P0448*) entsprechend der Spezies der der Primärantikörper entstammte in TBS-T für 1 h bei RT und lichtgeschützt. Es folgten weiter drei Waschschritte à 5 min. Zur Detektion der Proteine auf der Membran wurde die Membran vollständig mit Entwickler (ECL Western Blotting Substrate) benetzt und die entstehende Chemilumineszenz mit dem ChemiDoc™ XRS *Gel Imaging* System dokumentiert.

Zur relativen Quantifizierung der nachgewiesenen Proteine wurde in jeder Probe die Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH untersucht. Nach *Strippen* der Membranen (s.u.) wurden diese erneut in 5 % BSA in TBS-T geblockt und mit dem anti-GAPDH-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in 3 % BSA in TBS-T für 2 h bei RT inkubiert. Die Membranen wurden 3 x 5 min in TBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (*Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP #P0447*) für 1 h bei RT und lichtgeschützt inkubiert. Nach Waschen der Membranen wurden die Proteinbanden wie oben beschrieben mittels Chemilumineszenz detektiert. Die Bestimmung der Intensität der abgebildeten Banden erfolgte mit der *QuantityOne Software* von BioRad.

3.2.17 Blot-Stripping

Zur erneuten Markierung eines anderen Proteins auf derselben Membran ist es zunächst erforderlich, die bisher gebundenen Antikörper von der Nitrocellulosemembran zu entfernen. Jede Membran wurde mit 40 ml Stripping Puffer und 312 µl Mercaptoethanol für 20 min bei 60°C im Wasserbad geschüttelt und anschließend mehrfach gründlich mit PBS auf dem Schüttler bei RT gewaschen. Die gestrippten Membranen wurden erneut mit Blocklösung sowie mit einem neuen Primärantikörper (für GAPDH) reinkubiert.

3.2.18 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1

Das mitochondriale Membranpotential ist ein Indikator für die mitochondriale Integrität und gibt somit auch Aufschluss über die Vitalität einer Zelle. Dabei ist ein hohes mitochondriales Membranpotential charakteristisch für vitale Zellen mit einer intakten Mitochondrienmembran, während ein vermindertes mitochondriales Membranpotential auf Apoptose mit Desintegration der Mitochondrienmembran hinweist. Dieser Effekt lässt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 in der Durchflusszytometrie untersuchen. JC-1 ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff. In intakten Zellen reichert sich JC-1 gemäß seiner positiven Eigenladung im stark negativ geladenen Inneren der Mitochondrien an und bildet dort rot fluoreszierende sogenannte J-Aggregate. Ist die mitochondriale Membranfunktion gestört, kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. JC-1 bildet dann keine Aggregate im Mitochondrium, sondern verbleibt als Monomer im Cytoplasma. Diese Monomere fluoreszieren ihrerseits grün. Die Verschiebung des Emissionsspektrums von JC-1 von 590 nm (rot in vitalen Zellen, Darstellung im R1 *Gate*) zu 529 nm (grün in apoptotischen Zellen, Darstellung im R2 *Gate*) kann im Durchflusszytometer bestimmt werden und ist ein Maß für die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials. Die Dokumentation und Auswertung der Messdaten aus der Durchflusszytometrie erfolgte mit der Datenverarbeitungssoftware BD *CellQuestPro*[™]. Die Verschiebung des Emissionsspektrums von JC-1 wurde basierend auf dem FL1-H Wert mittels „gating“ im *Dot-Plot* quantifiziert. Abb. 6 zeigt exemplarisch die Darstellung von Zellen im R1 bzw. R2 *Gate* nach der durchflusszytometrischen Analyse einer Kontrollprobe.

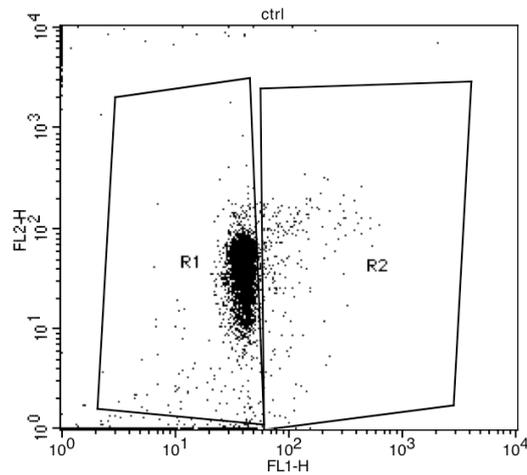


Abb. 6: Gating im Dot-Plot für PMN nach 4 h Zellkultur und JC-1 Färbung (ctrl). Die Mehrzahl der Zellen bildet sich im R1 Gate ab. Dies entspricht einer überwiegend roten Fluoreszenz wie sie in vitalen Zellen mit intakter Mitochondrienmembran auftritt.

3.2.19 Aktivitätsbestimmung von Caspase-3/-7 und -9 mittels Caspase Assay

Caspasen sind Schlüsselenzyme der Apoptose. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität in Proben mit apoptotischen Zellen erlaubt Rückschlüsse auf den Zelltodmechanismus der untersuchten Zellen. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Caspase-Aktivität ist die Analyse der Lumineszenz (Lichtentstehung) im Rahmen einer caspasenabhängigen Enzymreaktion, wie sie sich das Caspase-Glo™ Assay System von Promega zunutze macht. Dieser Assay verwendet einerseits Substrate für die zu untersuchende Caspase:

Caspase-3/-7 – Z-DEVD-aminoluciferin

Caspase-9 – Z-LEHD-aminoluciferin

und andererseits eine stabile Luciferase. Nur in Anwesenheit von aktiven Caspasen werden die Substrate gespalten und Aminoluciferin freigesetzt, welches als luminogenes Substrat für die Luciferase dient. Bei der Reaktion von Aminoluciferin mit der Luciferase entsteht Licht (Chemilumineszenz) proportional zur in der Probe vorhandenen Caspase-Aktivität. Das Prinzip des Caspase-Glo™ Assay Systems ist in Abb. 7 dargestellt.

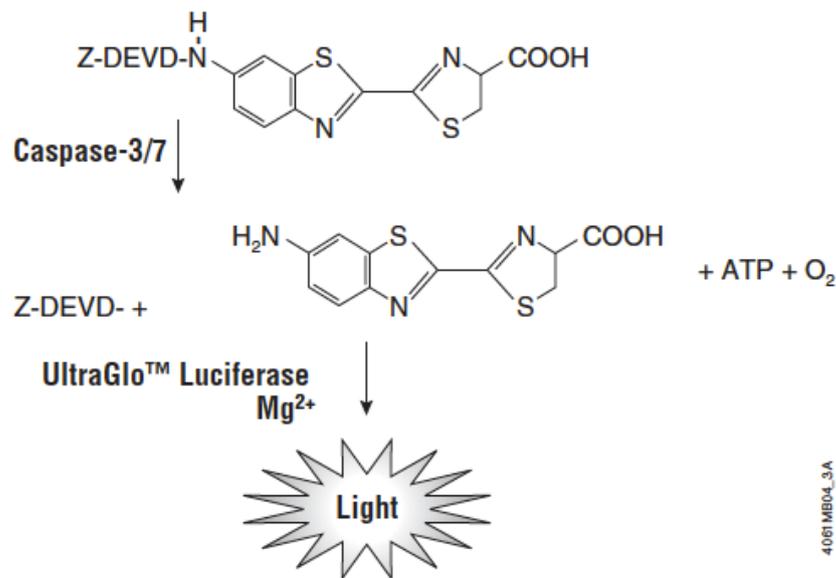


Abb. 7: Reaktionsprinzip des Caspase-Glo™ Assay Systems von Promega.

Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp (89).

Aus den zu untersuchenden Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt (s.o.) und unmittelbar im Anschluss und unter ständiger Kühlung weitergearbeitet, um einer unerwünschten Enzymreaktion vorzubeugen. Auf einer weißen 96 well Platte wurden jeweils 15 µg Protein in einem Gesamtvolumen von je 100 µl PBS vorgelegt. Gemäß Herstellerangaben wurde bei RT aus Substrat und Puffer der Caspase-Glo™-Reagent hergestellt und jeder Probe in äquivalenter Menge (100 µl) zugesetzt. Um Hintergrundlumineszenz zu detektieren, wurde in einem Well „blank“ gemessen, d.h. 100 µl PBS mit Caspase-Glo™-Reagent im Verhältnis 1:1, und der entsprechende Wert von allen Messwerten abgezogen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min (gekühlt) erfolgte die Messung der Lumineszenz im Photometer (Victor3™, Perkin Elmer).

3.2.20 Statistik

Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der metrischen Daten erfolgte mit dem Programm *GraphPad Prism* Version 5. Zur interferenzstatistischen Beurteilung wurde bei normalverteilten Werten der t-Test angewendet. Ein Unterschied wurde als signifikant erachtet bei Testergebnissen von $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt von ER-Stress auf die Apoptoserate von PMN gesunder Probanden sowie von ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen

Um die Auswirkungen von ER-Stress auf PMN gesunder Probanden und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen zu untersuchen, wurden frisch isolierte PMN gesunder Probanden und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen mit den ER-Stress-Induktoren Thapsigargin (TP; 3 μ M für HL-60 und PMN) und Tunicamycin (TM; 3 μ M HL-60; 6 μ M PMN) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 18 h wurde die Apoptoserate der Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Abb. 1 gibt jeweils ein exemplarisches Histogramm zur Quantifizierung der fragmentierten DNA wieder.

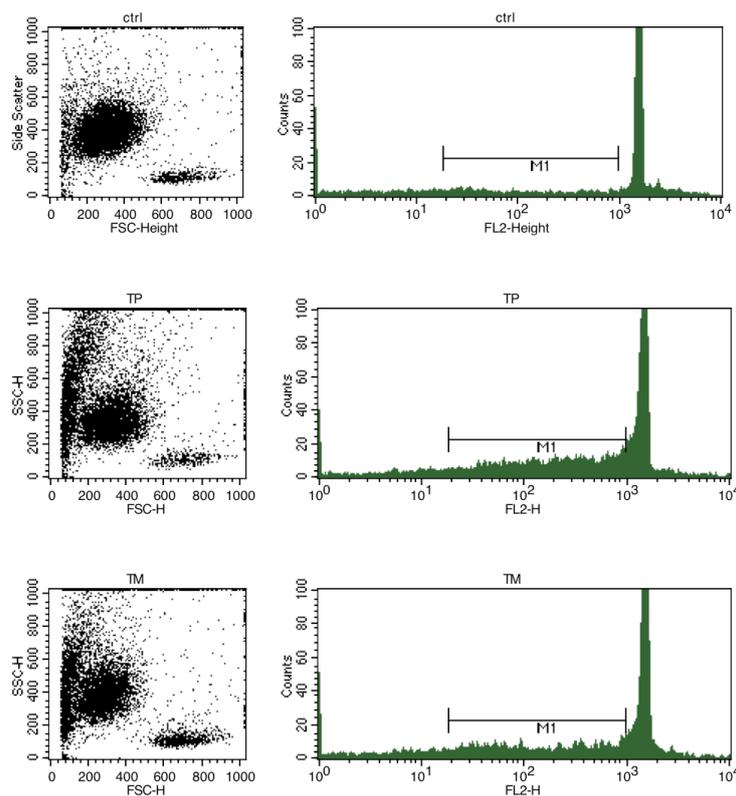


Abb. 1: Exemplarische Darstellung der graphischen Quantifizierung der Apoptoserate von PMN nach TP- bzw. TM-Behandlung. Im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) zeigt sich sowohl nach Behandlung mit TP als auch TM ein deutlicher Anstieg der gemessenen „events“ im subG1 Bereich als Maß für eine erhöhte Apoptoserate.

Abb. 2 stellt die prozentuale Apoptoserate der behandelten PMN und HL-60 Zellen nach 18 h dar. Die PMN gesunder Probanden zeigten dabei ein dichotomes Apoptoseverhalten nach TP-Behandlung, und sind deshalb gruppiert in *Responder* (Abb. 2 A), mit erhöhter Apoptoserate nach TP-Behandlung, und *non Responder* (Abb. 2 B), mit erniedrigter Apoptoserate nach TP-Behandlung, dargestellt. *Responder* zeigten eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate auf das dreifache nach TP-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (ctrl), während *non Responder*, ausgehend von einer höheren Grundapoptoserate in der Kontrolle, eine signifikante Abnahme der Apoptoserate nach TP-Behandlung aufwiesen. Die Behandlung mit TM führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der Apoptoserate, wobei dieser Effekt in der Gruppe der *non Responder* deutlich stärker ausgeprägt war. Die Begriffe *Responder* und *non Responder* werden im Weiteren bzgl. der Apoptoseantwort nach TP-Behandlung verwandt. Ausdifferenzierte HL-60 Zellen (Abb. 2 C) zeigten einheitlich eine signifikant erhöhte Apoptoserate nach Behandlung sowohl mit TP als auch mit TM.

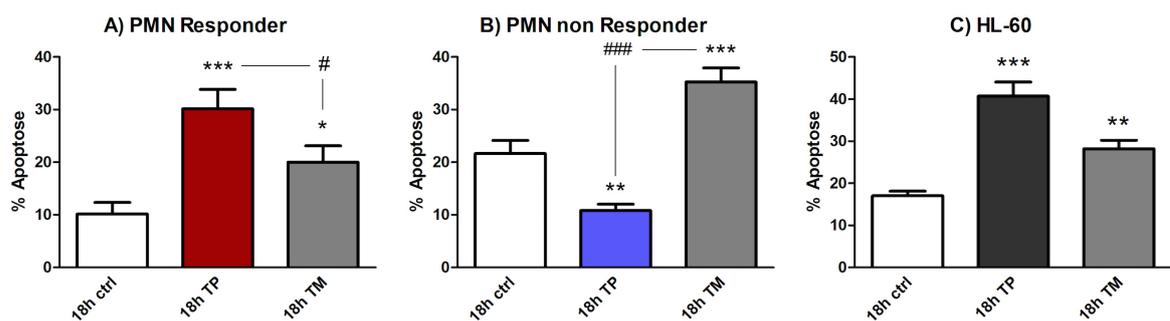


Abb. 2 A-C: ER-Stress-induzierte Apoptose in PMN gesunder Probanden und ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; n=18/B; n=9) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (C; n=9) wurden für 18 h mit TP (3µM) und TM (3µM für PMN/6µM für HL-60) in RPMI+5%FCS+1%PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die prozentuale Apoptoserate mittels FACS-Analyse ermittelt. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs ctrl. #p<0,05; ###p<0,001.

4.2 Effekt von ER-Stress auf die Apoptoserate von PMN polytraumatisierter Patienten

Zur Orientierung in der Frage, ob ER-Stress-induzierte Apoptose auch in PMN von polytraumatisierten Patienten relevant ist, wurden mehrfach Blutproben von auf der Intensivstation des UKD in Behandlung befindlichen Patienten mit Z.n Polytrauma entnommen. Aus den so an Tag 1, 5 und 10 nach Polytrauma gewonnen Proben wurden PMN isoliert und mit TP und TM behandelt. Abb. 3 stellt die prozentuale Apoptoserate der behandelten PMN nach 18 h dar. Von den insgesamt sechs Patienten, die im Untersuchungszeitraum für eine Probenentnahme zur Verfügung standen, konnte nur bei drei Patienten der vollständige Verlauf über alle drei Zeitpunkte erfasst werden. Zu den restlichen Zeitpunkten war eine Probenentnahme aus logistischen Gründen oder wegen einer Verlegung auf die Normalstation nicht mehr möglich. Die vorhandenen Proben wurden trotzdem in die Auswertung einbezogen.

An Tag 1 lässt sich tendenziell eine verminderte Sensitivität gegenüber TP und TM im Vergleich zu den PMN gesunder Probanden (Abb. 2) erkennen. Dabei ist zu bedenken, dass *Responder* und *non Responder* in dieser Auswertung gleichermaßen berücksichtigt worden sind, was zu einer breiten Streuung der Werte führt. An Tag 5 zeigt sich tendenziell ebenfalls nur eine sehr mäßige Zunahme der Apoptoserate. An Tag 10 zeigt sich hingegen eine deutliche Abnahme der Apoptoserate nach TP-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle und im Gegensatz zum Effekt der TM-Behandlung, entsprechend den *non Respondern* unter den gesunden Probanden. Alle an Tag 10 ausgewerteten Patienten-PMN zeigten gleichermaßen diese Reaktion auf TP, während die Patienten an den anderen Tagen in ähnlicher Weise uneinheitlich auf die TP-Behandlung reagierten, wie die PMN von gesunden Probanden.

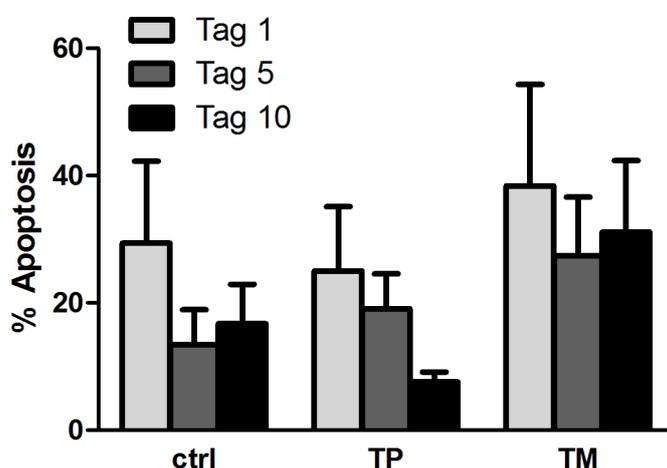


Abb. 3: ER-Stress-induzierte Apoptose in PMN von polytraumatisierten Patienten im zeitlichen Verlauf über 10 Tage post-traumatisch.

PMN polytraumatisierter Patienten (Tag 1/5/10: n=5/6/4) wurden für 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M) in RPMI+5%FCS+1%PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die prozentuale Apoptoserate mittels FACS-Analyse ermittelt.

4.3 ER-Stress-induzierte Veränderungen der Genexpression in PMN von gesunden Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen

ER-Stress und die möglicherweise folgende Apoptose sind mit der Induktion von charakteristischen Genen assoziiert. So führt ER-Stress unter anderem zu einer Induktion des ER-Chaperons Bip, eines UPR-Gens sowie im Zusammenhang nachfolgender Apoptose zur Induktion der pro-apoptotischen Faktoren Chop und Bim. Um zu untersuchen, inwiefern solche ER-Stress Marker auf Genebene auch in PMN induziert werden, wurden PMN mit TP und TM behandelt und die so gewonnenen Proben anschließend in der qPCR ausgewertet. Um darüber hinaus zu untersuchen, ob sich vergleichbare Effekte auch in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen nachweisen lassen, wurde diese in analoger Weise behandelt und analysiert.

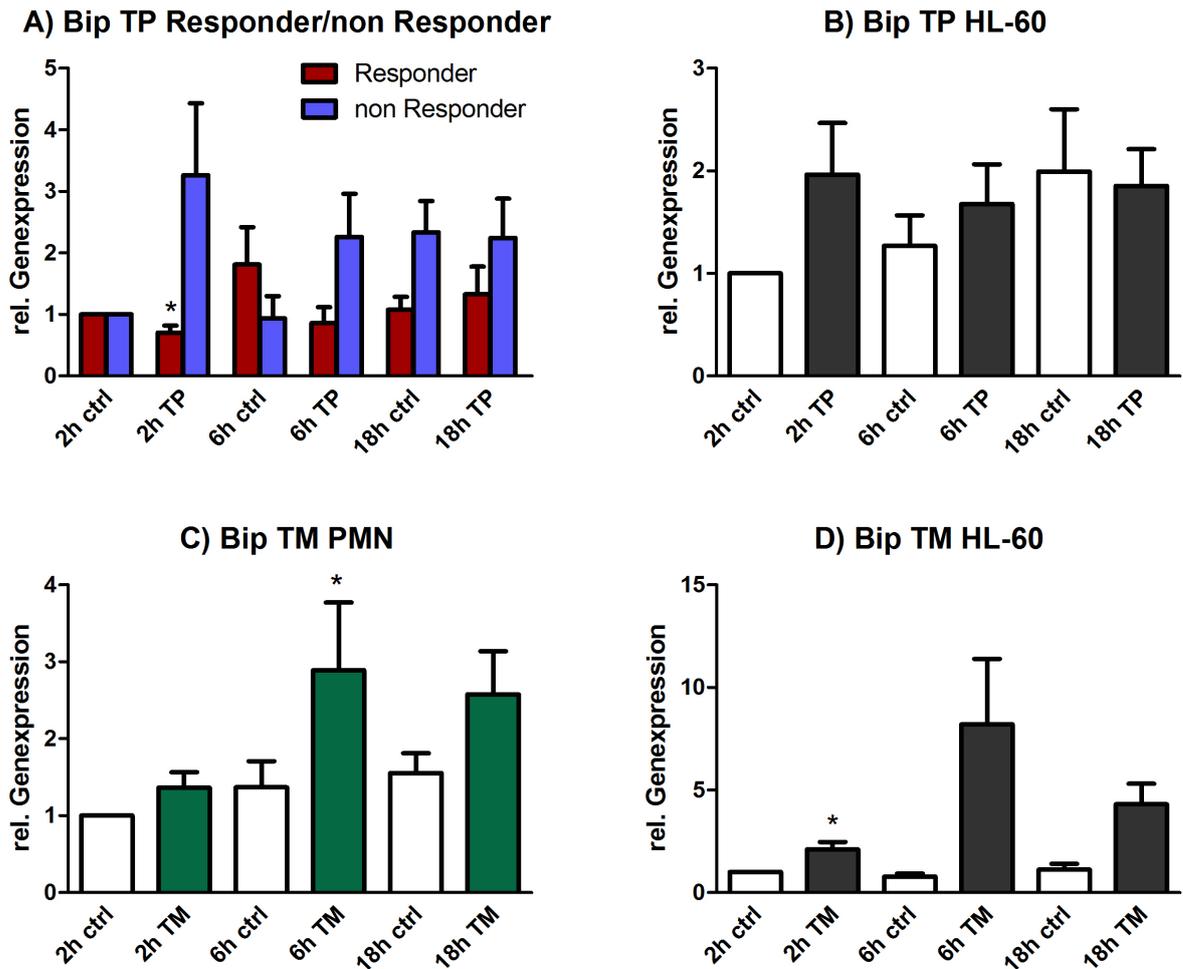
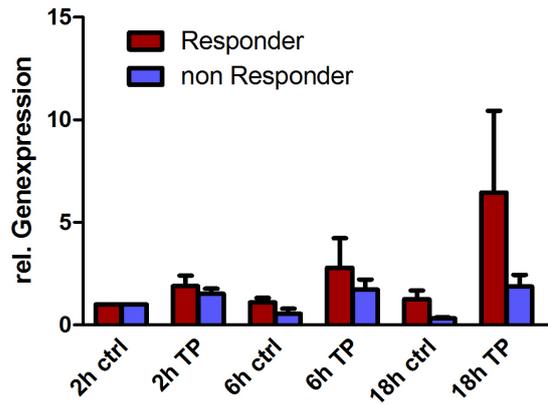


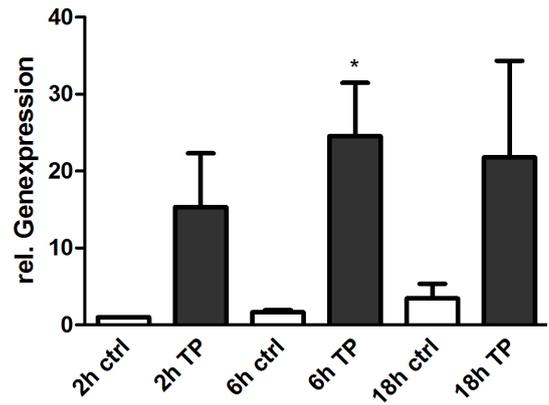
Abb. 4 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderung der Bip-Genexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; *Responder* n=7/*non Responder* n=4 und C; n=14) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (B; n=16 und D; n=5) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M für PMN/6 μ M für HL-60) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Genexpression von Bip mittels qPCR ermittelt. *p<0,05 vs ctrl.

Abb. 4 zeigt die Regulation der Bip-Genexpression. Während *Responder* nach 2 h eine signifikante Verminderung der Bip-Genexpression aufwies, zeigten *non Responder*, insbesondere nach 2 h und 6 h, im Vergleich zu den *Respondern* eher eine Zunahme der Bip-Genexpression (Abb. 4 A). HL-60 Zellen zeigten, wie die *non Responder*, am ehesten nach 2 h eine Zunahme der Bip-Genexpression (Abb. 4 B). Nach 18 h fand sowohl in PMN als auch in HL-60 Zellen keine nennenswerte Regulation mehr statt. Die Behandlung mit TM (Abb. 4 C und D) führte sowohl in PMN als auch in HL-60 Zellen zu einer deutlich vermehrten Bip-Genexpression zu allen Zeitpunkten, wobei der Effekt in PMN nach 6 h und in HL-60 Zellen nach 2 h statistisch signifikant war.

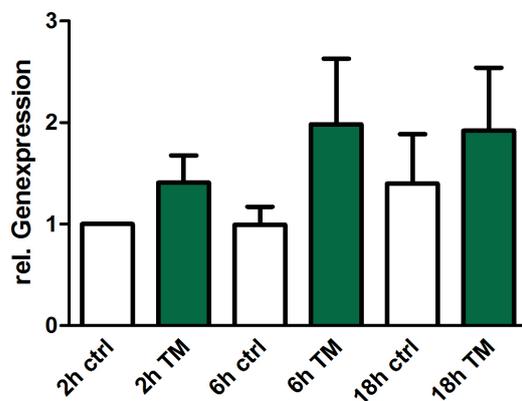
A) Chop TP Responder/non Responder



B) Chop TP HL-60



C) Chop TM PMN



D) Chop TM HL-60

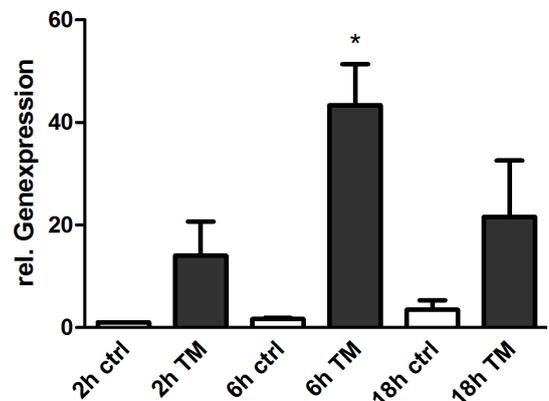


Abb. 5 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderung der Chop-Genexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; *Responder* n=6/*non Responder* n=4 und C; n=14) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (B; n=6 und D; n=6) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M für PMN/6 μ M für HL-60) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Genexpression von Chop mittels qPCR ermittelt. *p<0,05 vs ctrl.

Abb. 5 stellt die Genexpression von Chop in analoger Weise zu Abb. 4 dar. Die TP-Behandlung (Abb. 5 A und B) führte bei *Respondern*, *non Respondern* und HL-60 Zellen gleichermaßen zu einem Anstieg der Chop-Genexpression, der allerdings nur in HL-60 Zellen nach 6 h statistisch signifikant war. Chop wurde in HL-60 Zellen deutlicher hochreguliert als in PMN, und *non Responder* zeigten allenfalls eine minimale Tendenz zur TP-induzierten Chop-Induktion. Andererseits zeigten *non Responder* im zeitlichen Verlauf sogar eine leichte Abnahme der Chop-Genexpression in den unbehandelten Zellen (ctrl). Die Behandlung mit TM führte in PMN (Abb. 5 C) zu keiner signifikanten Chop-Regulation, während in HL-60 Zellen (Abb. 5 D), analog zur TP-Behandlung, nach 6 h eine signifikante Zunahme der Chop-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle sichtbar wurde.

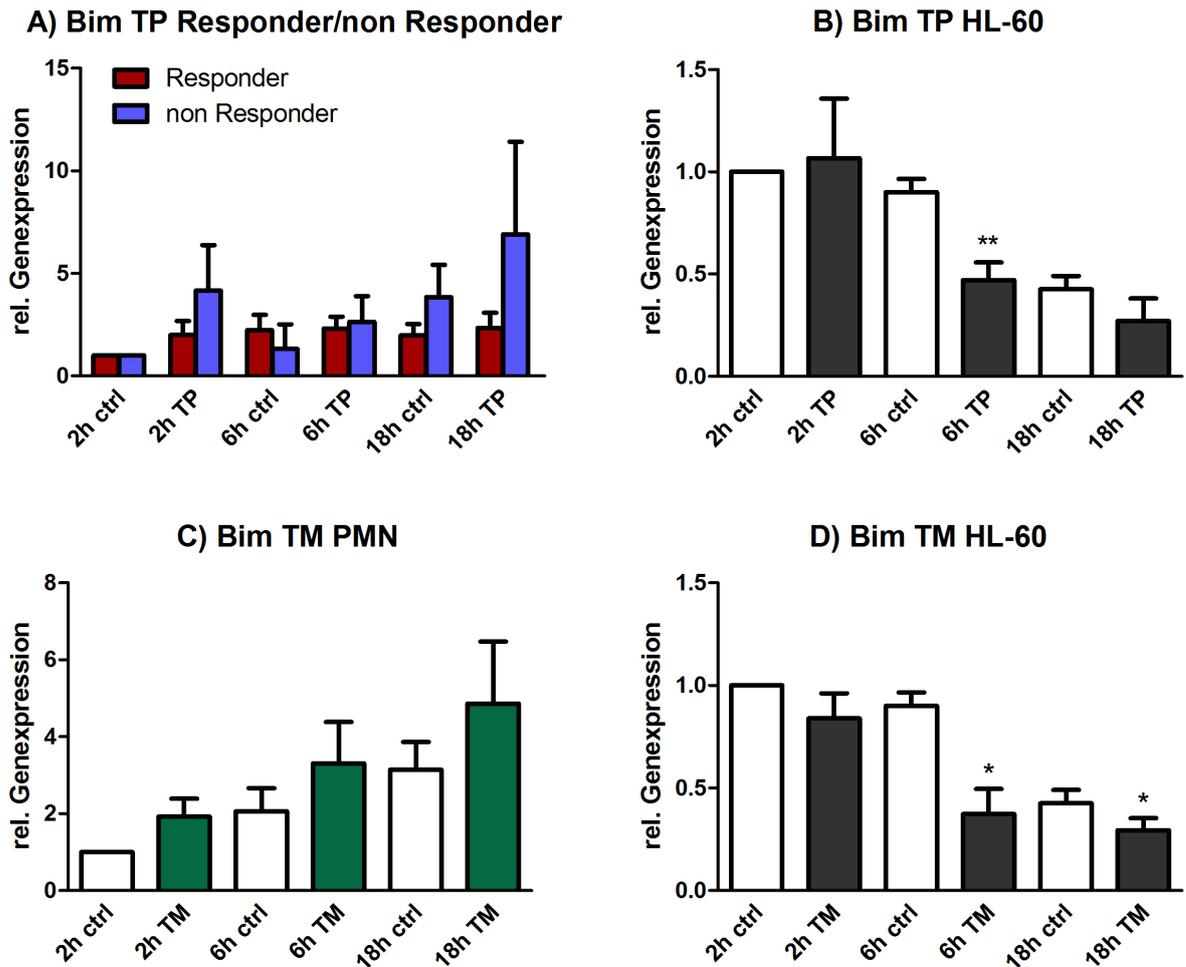


Abb. 6 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderung der Bim-Genexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; *Responder* n=8/*non Responder* n=4 und C; n=14) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (B; n=5 und D; n=5) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M für PMN/6 μ M für HL-60) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Genexpression von Bim mittels qPCR ermittelt. *p<0,05; **p<0,01 vs ctrl.

Abb. 6 stellt die Regulation der Bim-Genexpression dar. PMN zeigten nach TP-Behandlung keine signifikante Veränderung der Bim-Genexpression (Abb. 6 A). Während *Responder* auch keine nennenswerte Tendenz zeigten, war die Bim-Genexpression in *non Respondern* vor allem nach 2 h im Vergleich zur Kontrolle erkennbar erhöht. Diese Tendenz zeigte sich auch nach 6 h und nach 18 h. HL-60 Zellen hingegen wiesen nach 2 h und nach 18 h keine wesentliche Regulation im Vergleich zur Kontrolle auf, zeigten dafür aber nach 6 h eine signifikante Verminderung der Bim-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6 B). Nach TM-Behandlung zeigten PMN zu allen Zeitpunkten eine tendenzielle Zunahme der Bim-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, allerdings ohne statistische Signifikanz (Abb. 6 C). Der gegenteilige Effekt konnte in HL-60 Zellen beobachtet werden. Ähnlich wie

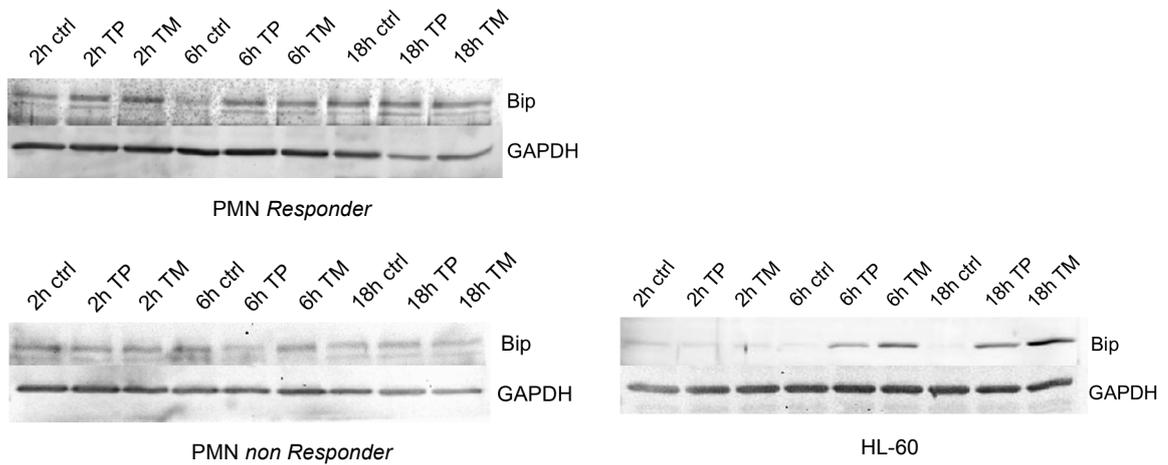
nach der Behandlung mit TP, kam es nach der Inkubation mit TM zu einer deutlichen Herunterregulation der Bip-Genexpression, die nach 6 h und 18 h signifikant ausfiel (Abb. 6 D).

4.4 ER-Stress-induzierte Veränderungen der Proteinexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen

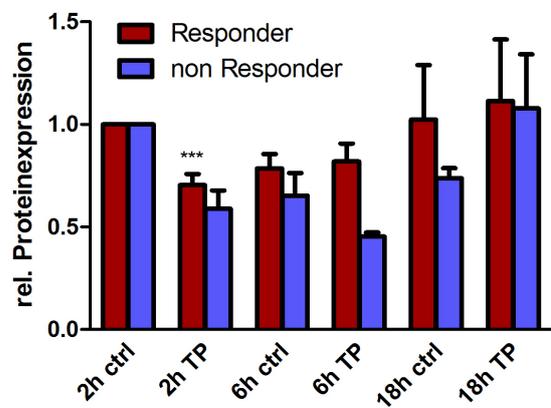
Um die Expression von Bip und Chop auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden PMN gesunder Probanden und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen für 2 h, 6 h und 18 h mit TP und TM inkubiert und die gewonnenen Proben im Western-Blot analysiert.

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, zeigten *Responder* 2 h nach der Behandlung mit TP eine signifikante Abnahme der Bip-Proteinexpression, nach 6 h bzw. 18 h aber keine Regulation mehr (Abb. 7 A). Ein tendenzieller Abfall der Bip-Proteinexpression war auch bei *non Respondern* nach 2 h bzw. 6 h erkennbar, lässt sich aber aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht statistisch belegen. Die scheinbare Erhöhung der Bip-Genexpression in *non Respondern* 18 h nach TP-Behandlung erscheint aufgrund der großen Standardabweichung bei geringer Fallzahl nicht relevant. In HL-60 Zellen hingegen war die Bip-Proteinexpression 6 h nach der Behandlung mit TP (Abb. 7 B) signifikant erhöht. Nach der Behandlung mit TM zeigten PMN überhaupt keine Regulation (Abb. 7 C), HL-60 Zellen hingegen eine signifikante Zunahme der Bip-Proteinexpression nach 6 h und nach 18 h (Abb. 7 D).

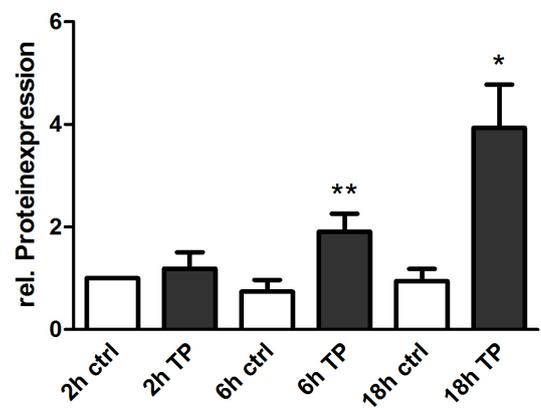
Die Chop-Proteinexpression (Abb. 8) zeigte sich lediglich in PMN 18 h nach TM-Behandlung signifikant erhöht (Abb. 8 C). Allerdings wurde in PMN nach TP Behandlung die Tendenz einer gegenläufigen Chop-Proteinexpression im Sinne einer Abnahme der Chop-Proteinexpression in *Respondern* bei einer Zunahme der Chop-Proteinexpression in *non Respondern* sichtbar, wobei der Effekt weniger TP- und eher zeitabhängig erscheint (Abb. 8 A). Weder nach TP- noch nach TM Behandlung wiesen HL-60 Zellen irgendeine Form der Regulation der Chop-Proteinexpression auf (Abb. 8 B und D).



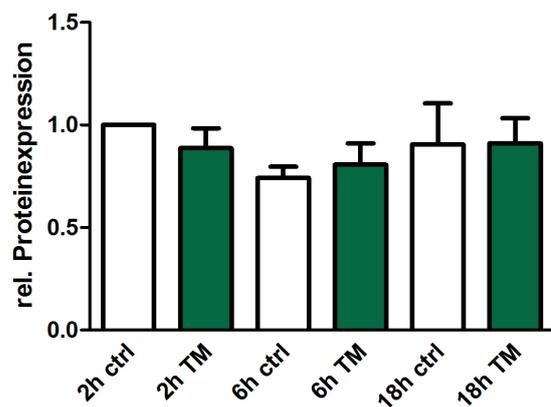
A) Bip TP Responder/non Responder



B) Bip TP HL-60



C) Bip TM PMN



D) Bip TM HL-60

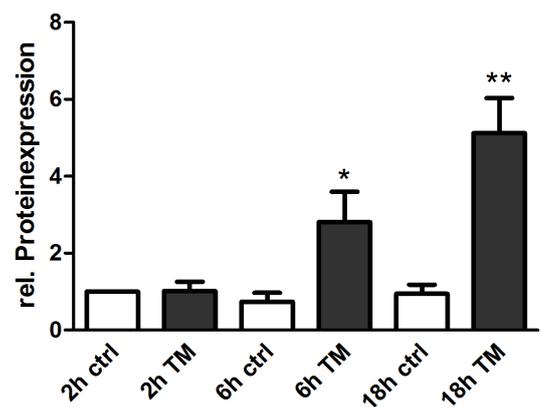
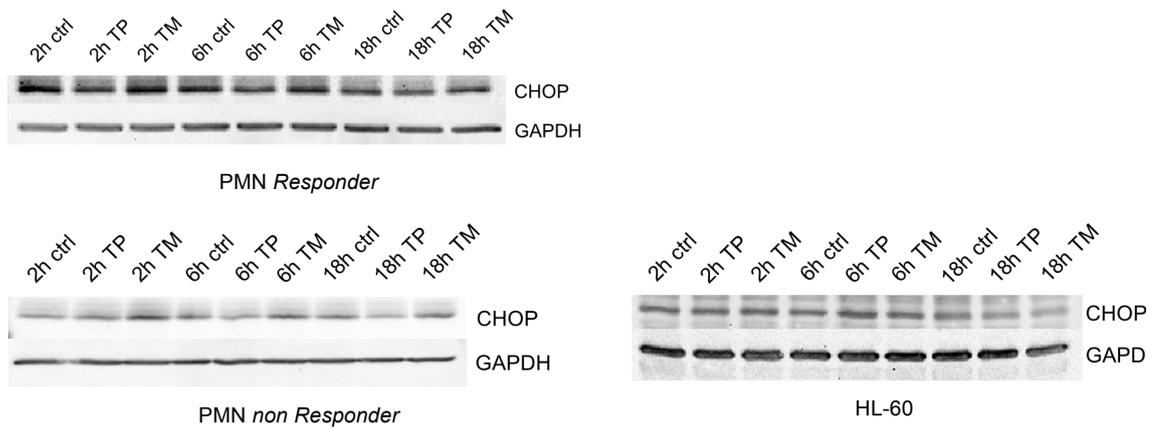
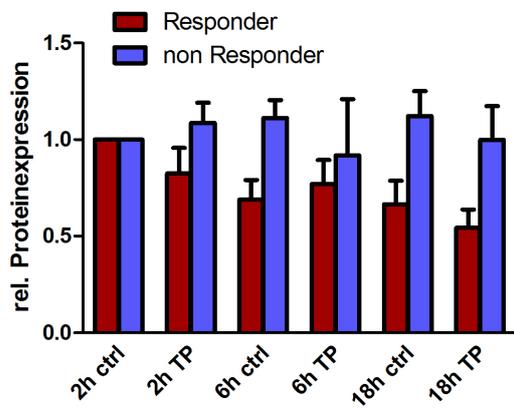


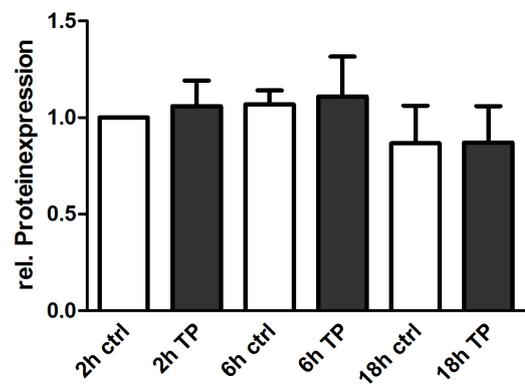
Abb. 7 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderung der Bip-Proteinexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; Responder n=8/non Responder n=2 und C; n=12) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (B; n=6 und D; n=6) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M für PMN/ 6 μ M für HL-60) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Proteinexpression von Bip mittels Western-Blot bestimmt. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs ctrl.



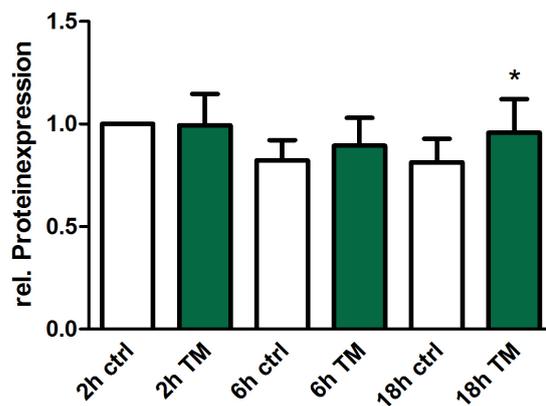
A) Chop TP Responder/non Responder



B) Chop TP HL-60



C) Chop TM PMN



D) Chop TM HL-60

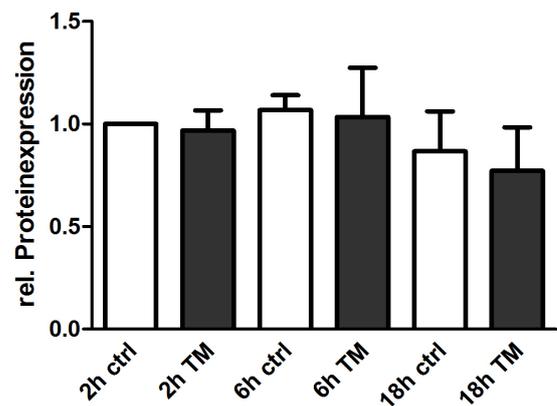


Abb. 8 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderung der Chop-Proteinexpression in PMN gesunder Probanden und in ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen. PMN gesunder Probanden (A; *Responder* n=6/*non Responder* n=3 und C; n=9) und ATRA-ausdifferenzierte HL-60 Zellen (B; n=4 und D; n=4) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M für PMN/6 μ M für HL-60) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Proteinexpression von Chop mittels Western-Blot bestimmt. *p<0,05 vs ctrl.

4.5 ER-Stress-induzierte Regulation der MCL-1 Proteinexpression und der Spaltung von Caspase-4 in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM

Dem BCL-2-Protein MCL-1 kommt bei der Apoptoseregulation in PMN eine große Bedeutung zu. Eine inverse Korrelation des intrazellulären MCL-1-Levels mit der Apoptoserate von PMN konnte unter anderem durch Versuche unserer eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden. Caspase-4 ist eine humane Caspase, die unter anderem in PMN exprimiert wird. Die Funktion dieser Caspase ist bisher noch nicht gut verstanden und wird eher in inflammatorischen Zusammenhängen vermutet. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass Caspase-4 an der Initiation der Apoptose in der Folge von ER-Stress beteiligt sein könnte.

Um zu untersuchen, ob MCL-1-Level auch im Rahmen ER-Stress-induzierter Apoptose in PMN auf Proteinebene reguliert werden sowie um die Frage nach einer Beteiligung von Caspase-4 an der Initiation ER-Stress-induzierter Apoptose zu beantworten, wurden PMN, wie bereits für die Untersuchungen unter 4.4 beschrieben, mit TP und TM behandelt und in Western-Blot Versuche eingesetzt.

Abb. 9 gibt die relative Proteinexpression von MCL-1 sowie die Spaltung von Caspase-4 als Maß für deren Aktivierung nach der Behandlung mit TP und TM in PMN gesunder Probanden wieder. Exemplarisch wurden repräsentative Western-Blots eingefügt. In die Versuche wurden nur Probanden eingesetzt, die nach TP-Behandlung mit einer Zunahme der prozentualen Apoptose reagiert hatten (*Responder*). Eine signifikante Regulation zeigte sich nur für MCL-1. Dabei kam es 2 h und 6 h nach TP-Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der MCL-1-Expression (Abb. 9 A) im Vergleich zur Kontrolle sowie 6 h nach TM-Behandlung zu einer weniger stark ausgeprägten Abnahme der MCL-1-Proteinexpression (Abb. 9 B). Caspase-4 zeigte 2 h nach der Behandlung mit TM eine Tendenz zur Aktivierung (Abb. 9 D), während nach 18 h sowohl nach TP- (Abb. 9 C) als auch nach TM-Behandlung (Abb. 9 D) eher eine Erhöhung des Quotienten von Grundform und Spaltprodukt erkennbar ist, was gegen eine Aktivierung der Caspase zu diesem Zeitpunkt spricht

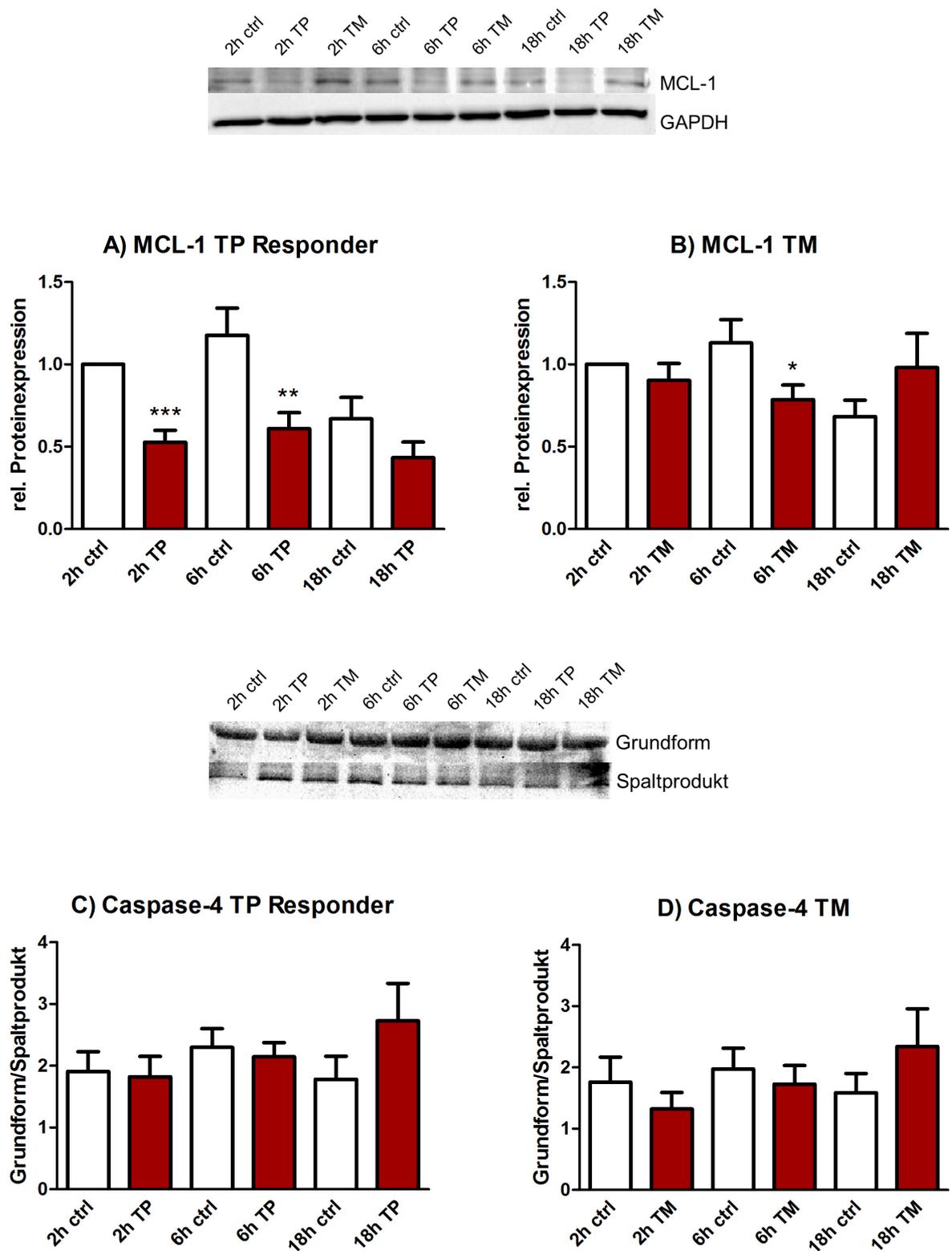


Abb. 9 A-D: ER-Stress-induzierte Veränderungen der MCL-1-Proteinexpression und Caspase-4-Aktivierung in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM. PMN gesunder Probanden (A; n=10, B; n=12, C; n=8, D; n=9) wurden für 2 h, 6 h und 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die relative Proteinexpression von MCL-1 sowie die Spaltung von Caspase-4 mittels Western-Blot bestimmt. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs ctrl.

4.6 ER-Stress-induzierte Veränderung der mitochondrialen Membranstabilität in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM

Im Rahmen der intrinsischen Apoptose kommt es durch die Aktivität pro-apoptotischer BCL-2 Proteine zu einer Porenformation in der äußeren Mitochondrienmembran. Neben dem Austritt von pro-apoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium führt die Porenformation zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Daher kann das mitochondriale Membranpotential als Maß für die Integrität der mitochondrialen Membran herangezogen werden.

Um zu untersuchen, ob ER-Stress-induzierte Apoptose in PMN mit einer Desintegration der Mitochondrienmembran einhergeht, wurden frisch isolierte PMN gesunder Probanden mit den ER-Stress-Induktoren TP und TM behandelt und für 4 h bzw. 18 h bei 37 °C inkubiert. Der lipophile, kationische Fluoreszenzfarbstoff JC-1 reichert sich in intakten Zellen im negativ geladenen Inneren der Mitochondrien an und bildet dort rot fluoreszierende Aggregate. Ist die mitochondriale Membranfunktion gestört, kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. JC-1 verbleibt daraufhin als Monomer im Cytoplasma. Diese Monomere fluoreszieren ihrerseits grün. Die Verschiebung des Emissionsspektrums kann im Durchflusszytometer bestimmt und als Maß für die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials verwendet werden. Anhand des FL1-H-Wertes lassen sich im *Dot-Plot* Gates um die entsprechenden Fluoreszenzbereiche legen (Abb. 10) und sich so die Verschiebung von Zellen aus dem einen in den anderen Bereich graphisch darstellen und auswerten. Hier wurde das R1 *Gate* um vitale Zellen mit roter Fluoreszenz gelegt, während das R2 *Gate* apoptotische Zellen mit gestörtem Membranpotential und grüner Fluoreszenz beinhaltet.

Die prozentuale Verlagerung von mit TP- bzw. TM-behandelten Zellen aus dem R1 *Gate* in das R2 *Gate* im Vergleich zur Kontrolle als indirektes Maß für die Destabilisierung der mitochondrialen Membran ist in Abb. 11 dargestellt. Bereits unbehandelte Zellen wiesen nach 18 h einen deutlichen höheren Anteil im R2 *Gate* auf als nach 4 h. Die Behandlung mit TP ergab bereits nach 4 h eine signifikante Erhöhung des Zellanteils im R2 *Gate* im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit TM hingegen hatte nach 4 h noch keinen nennenswerten Effekt. Nach 18 h zeigte sich allerdings auch hier eine signifikante Zunahme von Zellen im R2 *Gate*.

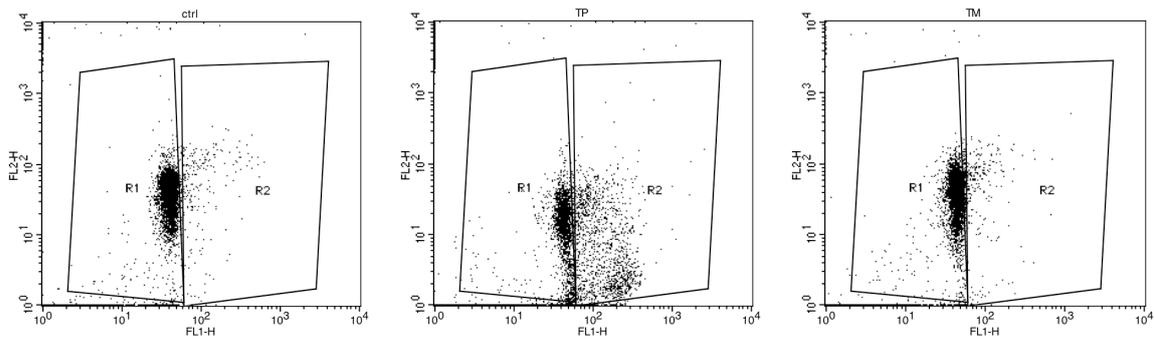


Abb. 10: Exemplarische Darstellung der graphischen Auswertung der mitochondrialen Membranstabilität anhand der Fluoreszenz nach TP- bzw. TM-Behandlung für PMN mit Apoptoseantwort. Im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) zeigt sich nach 4 h bei der Behandlung mit TP, anders als bei der Behandlung mit TM, eine deutliche Verlagerung der gemessenen Zellen entlang der x-Achse in das R2 Gate. Dies entspricht einer vermehrten grünen Fluoreszenz, wie sie in apoptotischen Zellen mit instabiler Mitochondrienmembran auftritt.

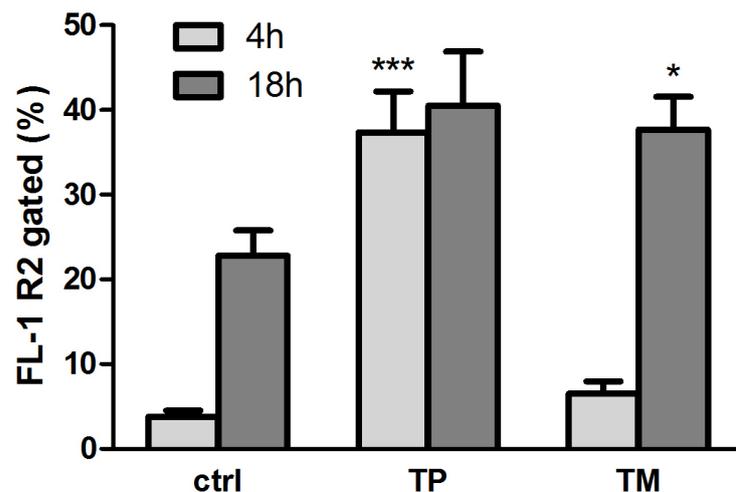


Abb. 11: ER-Stress-induzierte Veränderungen der mitochondrialen Membranstabilität in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM. PMN gesunder Probanden (n=9) wurden für 4 h bzw. 18 h mit TP (3 μ M) und TM (3 μ M) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von Zellen im R2 Gate als indirektes Maß für die Destabilisierung der mitochondrialen Membran mittels FACS-Analyse ermittelt. *p<0,05; ***p<0,001 vs ctrl.

4.7 ER-Stress-induzierte Aktivierung von Caspase-3/-7 und -9 in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM

Caspase-3/-7 und Casapse-9 sind Schlüsselenzyme der Apoptose. Die Caspasen-3/-7 sind Effektorcaspasen und essentiell für die Exekution der Apoptose. Caspase-9 ist eine Initiatorcaspase, die im Rahmen der intrinsischen Initiation der Apoptose durch das Apoptosom aktiviert wird, und ihrerseits *downstream* Effektorcaspasen aktiviert. Um zu untersuchen, ob und mit welcher Zeitkinetik diese Caspasen im Rahmen von ER-Stress-induzierter Apoptose aktiviert werden, wurde ER-Stress in PMN gesunder Probanden mittels TP und TM induziert. In Abb. 12 ist die Aktivität von Caspase-3/-7 und Caspase-9 in PMN von gesunden Probanden nach der Behandlung mit TP (Abb. 12 A) bzw. TM (Abb. 12 B) dargestellt. Es wurde nur in solchen Zellen die Caspasen-Aktivierung untersucht, die zuvor eine erhöhte Apoptoserate nach der Behandlung mit TP aufgewiesen hatten (*Responder*).

Wie aus der Darstellung hervorgeht, führte die TP-Behandlung bereits nach 4 h zu einer signifikanten Zunahme der Aktivierung von Caspase-3/-7 und -9 in den untersuchten Zellen (Abb. 12 A). Auch 4 h nach der Behandlung mit TM zeigten sich sowohl Caspase-3/-7 als auch Caspase-9 signifikant erhöht (Abb. 12 B). Da die Erhöhung jedoch wesentlich weniger drastisch ausfiel als nach der TP-Behandlung, wurden weitere Caspase-*Assays* zu späteren Zeitpunkten angeschlossen, um die Möglichkeit einer unterschiedlichen Zeitkinetik zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Caspasen-Aktivierung im zeitlichen Verlauf bereits in den Kontrollen am ehesten im Rahmen von spontaner Apoptose. Anders als nach 4 h ergab die Behandlung mit TM nach 9 h und nach 18 h keine signifikante Erhöhung der Aktivierung von Caspase-3/-7 im Vergleich zur Kontrolle mehr, während sowohl nach 9 h als auch nach 18 h die Aktivität von Caspase-9 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht war.

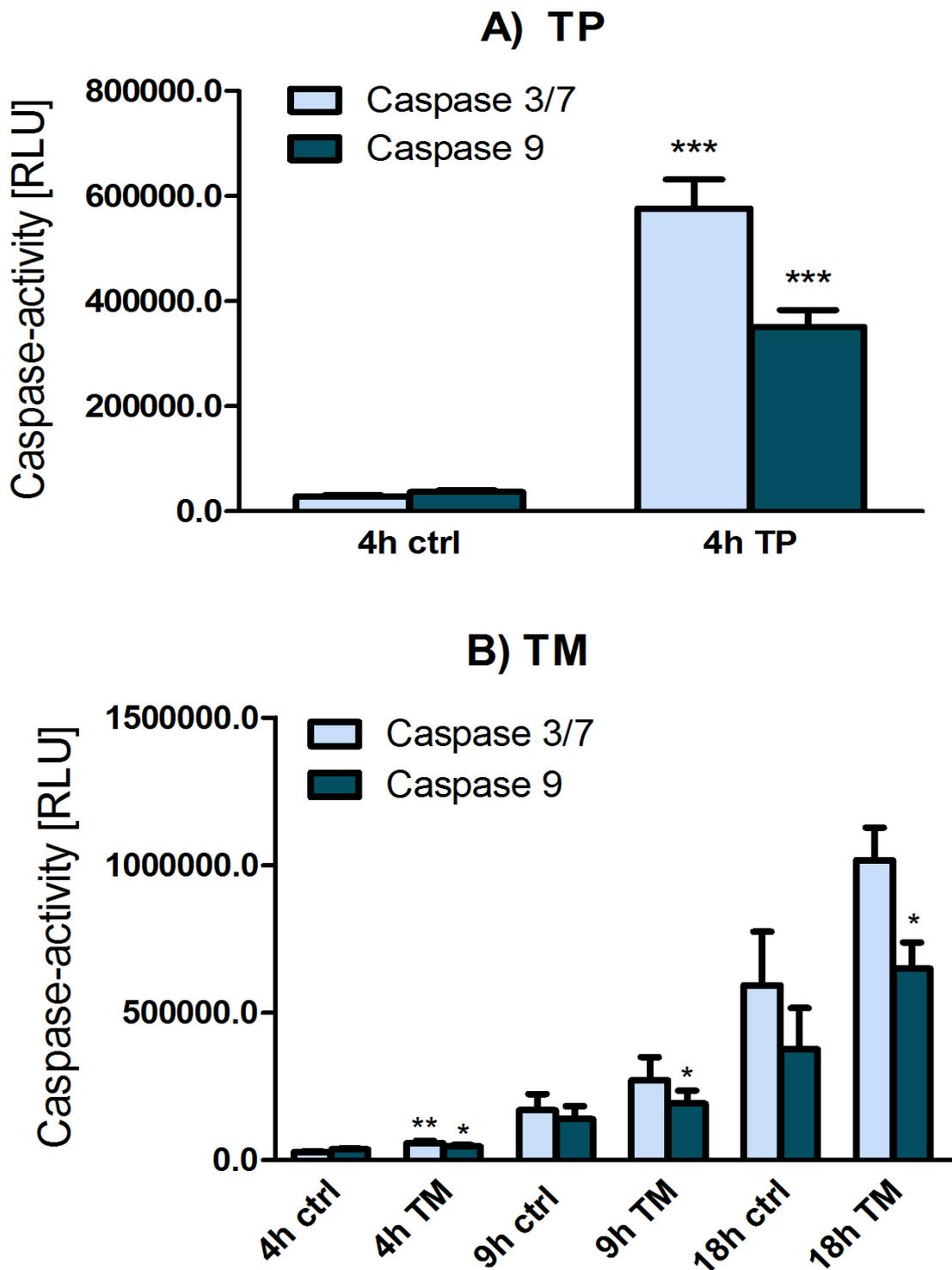


Abb. 12 A und B: ER-Stress-induzierte Aktivierung von Caspase-3/-7 und -9 in PMN gesunder Probanden mit Apoptoseantwort auf TP (*Responder*) und TM. PMN gesunder Probanden wurden für 4 h (n=8), 9 h (n=3) und 18 h (n=3) mit TP (3 μ M) bzw. TM (6 μ M) in RPMI+5 % FCS+1 % PS bei 37 C° inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität von Caspase-3/-7 und Caspase-9 mit Hilfe des Caspase-Glo™ Assay Systems von Promega bestimmt. Die Lumineszenz ist als Maß für die Caspase-Aktivität als (*Assay-spezifische*) „relative light units“ (RLU) angegeben. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs ctrl.

5 Diskussion

PMN sind quantitativ wie auch qualitativ wichtige Zellen der angeborenen Abwehr und darüber hinaus von großer Bedeutung für die Resolution von Inflammation. Mit ihrem gewebstoxischen Potential andererseits tragen sie aber auch zur Entstehung verschiedener Pathologien bei, darunter vermutlich MODS und MOF nach schwerem Trauma. Dabei scheint eine Verzögerung der spontanen PMN-Apoptose, wie sie sowohl nach schwerem Trauma als auch im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen nachgewiesen werden kann, von pathogenetischer Bedeutung zu sein. Daher sollte in dieser Arbeit der in PMN bisher wenig erforschte Prozess ER-Stress-induzierter Apoptose in diesen Zellen näher charakterisiert werden. Es wurde der Effekt der ER-Stress Induktoren Thapsigargin (TP) und Tunicamycin (TM) auf die prozentuale Apoptoserate sowie die Regulation von sowohl für ER-Stress-induzierte Apoptose etablierten als auch potentiell relevanten Genprodukten in PMN und ATRA-ausdifferenzierten HL-60 Zellen untersucht.

Zunächst ergaben unsere Untersuchungen der Apoptoserate von PMN und HL-60 Zellen nach TP- und TM-Behandlung in PMN eine differentielle Apoptoseantwort auf TP. Anders als TM führte TP sowohl in PMN gesunder Probanden als auch in PMN von Traumapatienten teilweise zu einer Erhöhung der Apoptoserate, teilweise aber auch zu einer signifikanten Verminderung der Apoptoserate, während HL-60 Zellen einheitlich mit vermehrter Apoptose reagierten. Die Eigenschaft der PMN als „*Responder*“ oder „*non Responder*“ war nicht an den individuellen Spender gebunden. PMN vom selben Spender reagierten in mehreren Versuchsansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich. Die *non Responder* gesunder Probanden wiesen dabei eine um den Faktor eins höhere mittlere Grundapoptose in der Kontrolle auf als *Responder*. Die Untersuchung des proapoptotischen Effektes von TP und TM auf PMN aus polytraumatisierten Patienten stand nicht im Fokus dieser Arbeit. Auffällig war jedoch, dass Trauma-PMN eine Tendenz zur Entwicklung der „*non Responder*“-Eigenschaft im zeitlichen Verlauf aufwiesen. So reagierten alle untersuchten Zellen von polytraumatisierten Patienten am 10. post-traumatischen Tag ausnahmslos mit einer verminderten Apoptoserate nach TP-Behandlung (*non Responder*). Trotz der geringen Fallzahl bildet diese Beobachtung einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Apoptoseresistenz in PMN polytraumatisierter Patienten.

Bei der Untersuchung der Gen- und Proteinexpression in PMN ergaben sich zum Teil große intraindividuelle Schwankungen mit teilweise sogar gegenteiligen Individualaussagen, hohem Standardfehler und entsprechend wenig signifikanten Ergebnissen. Dies ist ein häufiger Befund bei der Untersuchung von PMN, da es sich bei diesen Zellen um sehr empfindliche und nur schlecht kultivierbare Zellen des Immunsystems handelt, die darüber hinaus von unterschiedlichen Individuen zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen wurden.

Das ER-Chaperon Bip ist maßgeblich an der Aktivierung der UPR beteiligt, indem es die Schlüsselmoleküle PERK, IRE1 α und ATF6 im Rahmen von ER-Stress aus den Komplexen freigibt, die es unter physiologischen Bedingungen mit diesen Molekülen bildet. Darüber hinaus ist Bip selbst ein Zielgen der UPR, wird von ATF6 induziert und unterstützt daraufhin die Proteinfaltung im ER. Bip-Induktion gilt daher als Indikator für ER-Stress, der insbesondere durch TP und TM induziert werden kann (90). Eine Induktion von Bip erhöht die Faltkapazität des ER und trägt ggf. zur rechtzeitigen Deaktivierung von IRE1 α und somit zur Prävention der von diesem Zweig der UPR unter Umständen ausgehenden Apoptose bei (91). Des Weiteren resultiert eine Überexpression von Bip im Rahmen von ER-Stress in einem Induktionsstop des pro-apoptischen Faktors Chop (92). Bip ist also vorrangig als *pro-survival* Faktor einzuordnen. Dabei ist die Rolle von Bip im Rahmen der Zelltodregulation insbesondere durch die Erforschung verschiedener maligner Zellen inzwischen gut belegt (93)(94). Xu et al. untersuchten kürzlich die Proteinexpression von Bip in peripheren Ratten-PMN in einem Tiermodell für akute Pankreatitis (95). Dabei ging eine signifikant verlängerte Lebensdauer von PMN der Pankreatitis-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit einer signifikanten Zunahme der Bip-Proteinexpression einher, deren Auslöser die Autoren in der verminderten Ca²⁺-Konzentration und der Akkumulation toxischer Substanzen, also in einer Form von ER-Stress, im entzündlichen Milieu der Pankreatitis sehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Bip in *Respondern*, *non Respondern* und HL-60 Zellen unterschiedlich reguliert. Auch die ER-Stress Induktion führte je nach TP oder TM zu einer unterschiedlichen Bip-Expression. Im Einklang mit der Vorstellung von Bip als anti-apoptotischem Faktor steht unser Ergebnis einer signifikant verminderten Gen- und Proteinexpression von Bip in *Respondern* 2 h nach der Behandlung mit TP, während *non Responder* zum gleichen Zeitpunkt tendenziell eine Erhöhung der Genexpression von Bip zeigten. Die Proteinexpression von Bip in *non Respondern* war allerdings in unserer Studie, anders als man aufgrund der Ergebnisse von Xu et. al erwarten würde (95), wie in den *Respondern* insbesondere nach 2 h tendenziell deutlich vermindert. Obwohl die Interpretation dieser Ergebnisse unter dem Vorbehalt einer sehr geringen Fallzahl von n=2 für die

Proteinexpression in *non Respondern* zu erfolgen hat, lässt sich dennoch daraus schließen, dass es zwar Unterschiede in der Genregulation von Bip in *Respondern* und *non Respondern* als Reaktion auf TP-Behandlung gibt, dass diese aber, da sie sich anscheinend nicht auf die Proteinebene übersetzen, nicht ursächlich mit der beobachteten TP Resistenz in Zusammenhang stehen. Dafür spricht auch das Verhalten der untersuchten HL-60 Zellen, die zwar genau wie *non Responder* tendenziell eine Zunahme der Bip-Genexpression aufwiesen, die aber trotz einer ebenfalls deutlichen Zunahme der Proteinexpression nach 6 h und nach 18 h vermehrt in die Apoptose gegangen waren. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist die Bip-Proteinexpression also weder in PMN noch in HL-60 Zellen als potenter, anti-apoptotischer Faktor anzunehmen. Es könnte allerdings interessant sein, die Zeitkinetik der Entwicklung von Apoptose nach TP-Behandlung zu untersuchen. Möglicherweise werden Zellen mit verminderter Bip-Genexpression schneller apoptotisch als solche mit einer Zunahme der Bip-Genexpression, weil die Bewältigung des initiierten ER-Stresses in solchen Zellen behindert ist. Die Behandlung mit TM ergab in PMN und HL-60 Zellen gleichermaßen eine Zunahme der Apoptose sowie eine signifikante Zunahme der Genexpression von Bip nach 6 h in PMN und nach 2 h in HL-60 Zellen, vereinbar mit einer TM-abhängigen ER-Stress Induktion. Ähnliche Ergebnisse für PMN erhielten Binet et. al (68), wobei diese Gruppe eine Zunahme der Bip-Genexpression als Reaktion auf TM-Behandlung in PMN bereits nach 1 h beschreibt. Auf Proteinebene zeigte sich nur in HL-60 Zellen eine signifikante Zunahme der Bip-Expression und zwar genau wie nach TP nach 6 h und nach 18 h, während in PMN keinerlei Regulation nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen ebenfalls, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Bip-Proteinlevel und dem Apoptoseverhalten von PMN oder HL-60 Zellen als Reaktion auf TP oder TM gibt.

Chop ist ein pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor in der ER-Stress-vermittelten Apoptose, dessen eigene transkriptionelle Regulation über alle drei Arme der UPR erfolgt. Die Promotorregion des Chop-Gens enthält Bindungsstellen sowohl für ATF6 als auch für XBP1 und ATF4. ATF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der PERK-Achse durch die Phosphorylierung von eIF2 α einen selektiven Vorteil erhält und den globalen Translationsstop umgeht (96). PERK und eIF2 α sind essentiell für die Induktion von Chop im Rahmen von ER-Stress, Chop ist aber nicht essentiell für ER-Stress-induzierte Apoptose (97)(98). Verschiedene Mechanismen für Chop-vermittelte Apoptose sind inzwischen bekannt. Chop induziert die Expression von Bim (99). Möglicherweise führt Chop auch zu einer BCL-2 Suppression, was die Apoptose begünstigt (100). Dieser Zusammenhang konnte aber in anderen Versuchen nicht sicher reproduziert werden (99). Außerdem konnte im

Rahmen von ER-Stress eine Chop-abhängige Hochregulation des pro-apoptotischen Effektorproteins BAX gezeigt werden (101). Im Bezug auf PMN zeigten Li et al. (102) kürzlich anhand eines Mausmodells für kardiale Inflammation, dass Chop-Defizienz die Apoptoserate von PMN im Rahmen von Angiotensin-II-induziertem ER-Stress senkt.

In unseren Versuchen mit TP zeigte sich in *Respondern*, *non Respondern* und HL-60 Zellen gleichermaßen eine Erhöhung der Chop-Genexpression, welche aber nur in HL-60 Zellen nach 6 h statistisch signifikant ausfiel. Auch wenn es sich dabei nur um eine Tendenz handelt, wurde eine Zunahme der Chop-Genexpression nur in *Respondern* gesehen. *Non Responder* zeigten im zeitlichen Verlauf sogar eher eine Abnahme der Chop-Genexpression in den Kontrollen, was ein Hinweis auf eine unterschiedliche Konstitution von *Respondern* und *non Respondern* sein könnte, die in einer unterschiedlichen Induzierbarkeit von Chop resultiert. Eine verminderte ER-Stress-Sensibilität aufgrund unzureichender Chop-Aktivierung in *non Respondern*, mit dem Ergebnis einer verminderten Apoptoserate nach TP-Behandlung, wäre ein möglicher Ansatzpunkt für die Erklärung der unterschiedlichen Apoptoseantwort von PMN auf TP, allerdings gab es auf Proteinebene keine Entsprechung zu diesem Befund. Hier zeigten *non Responder* und HL-60 Zellen, trotz ihres unterschiedlichen Apoptoseverhaltens, beide keine Regulation der Chop-Proteinexpression, während in *Respondern* sogar tendenziell eine Abnahme erkennbar ist. Dies ist ein scheinbarer Widerspruch zu der Vorstellung von Chop als potentem Effektor ER-Stress-induzierter Apoptose, andererseits ist Chop für ER-Stress-induzierte Apoptose nicht essentiell, so dass die Apoptose in *Respondern* über andere, von uns nicht untersuchte Wege eingeleitet worden sein kann. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Aspekt ist die Tatsache, dass Chop als Transkriptionsfaktor im Zellkern akkumuliert und möglicherweise daher in der von uns untersuchten zytosolischen Fraktion nicht nachgewiesen werden konnte. Dies stellt daher eine Limitierung dieser Arbeit dar.

TM führte, im Einklang mit der Studie von Binet et al. (68) in PMN und HL-60 Zellen, zu einer Zunahme der Chop-Genexpression, die jedoch wie auch schon nach TP nur in HL-60 Zellen nach 6 h statistisch signifikant war. Durch TP und durch TM induzierter ER-Stress führte also in HL-60 Zellen gleichermaßen zu einer signifikanten Zunahme der Chop-Genexpression nach 6 h. Auf Proteinebene ergab die TM-Behandlung nach 18 h in PMN im Einklang mit der erhöhten Apoptoserate eine signifikant erhöhte Chop-Expression. In HL-60 Zellen zeigte sich trotz vermehrter Apoptose, genau wie nach TP, keine Veränderung des Proteinlevels. Weder TP noch TM führten also in HL-60 Zellen zu einer Veränderung der Chop-Proteinexpression. Chop ist demnach in HL-60 Zellen entweder nicht maßgeblich an der Initiation der Apoptose durch ER-Stress beteiligt, oder ein möglicherweise erhöhtes nukleäres Proteinlevel wurde bei unserer Untersuchung der zytosolischen Fraktion nicht

detektiert. Der Effekt könnte auch posttranslational entstehen. Wang et al. (103) zeigten 1996, dass eine p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-abhängige Phosphorylierung von Chop an Ser78 und Ser81, dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor erhöht und zur vollen Entfaltung der inhibitorischen Effekte von Chop im Rahmen der Fettzellendifferenzierung notwendig ist. In einer späteren Studie zeigten Maytin et al. (27) nicht nur einen direkten Zusammenhang zwischen einer Chop-Überexpression und Apoptose in Fibroblasten, Keratinozyten und HeLa-Zellen, sondern untersuchten auch die Bedeutung von p38 MAPK in diesem Kontext. Eine gleichzeitige Überexpression von p38 MAPK und Chop führte dabei zu einer signifikanten Zunahme der Apoptoserate gegenüber der Überexpression von Chop alleine. Gleichzeitig führte eine Deletion des N-Terminus mit Ser 78 und Ser81 nicht zu einer wesentlichen Einschränkung des apoptotischen Effekts von Chop gegenüber dem Wildtyp. Eine posttranslationale Phosphorylierung und eine daraus folgende erhöhte pro-apoptotische Aktivität von Chop ist demnach eine mögliche Erklärung für die beobachtete Zunahme der Apoptoserate, ohne nachweisbare Erhöhung der zytosolischen Proteinexpression in HL-60 Zellen. Anders als in HL-60 Zellen war in PMN nach 18 h eine signifikante Zunahme der Chop-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Da es an der Stelle allenfalls eine tendenzielle Regulation der Genexpression gab, ist am ehesten von posttranskriptioneller Regulation auszugehen.

Generell muss berücksichtigt werden, dass Chop wohl eher keine universelle Funktion zugeschrieben werden kann, die in verschiedenen Zellen und unter verschiedenen Umständen gültig wäre. Das unterstreichen vor allem die Ergebnisse einer Studie aus dem Jahre 2010 an Antikörper-sezernierenden Zellen (ASC) (104). Dabei wurden primäre B-Lymphozyten durch Stimulation mit LPS zur Differenzierung in ASC angeregt, einem Prozess, der mit einer Expansion des ER und der Induktion verschiedener UPR-Elemente einhergeht. Verglichen wurden primäre B-Lymphozyten, ASC und Fibroblasten jeweils von Wildtypmäusen und Chop^{-/-}-Mäusen. Eine Behandlung mit TP und TM ergab lediglich in Fibroblasten die erwartete Verminderung der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle, wohingegen Chop-defiziente B-Lymphozyten und ASC nicht weniger, sondern teilweise sogar vermehrt (ASC) mit Apoptose reagierten. Die Rolle von Chop erscheint somit Zelltyp- und Kontextabhängig. Eine mögliche Erklärung für die scheinbar uneinheitlichen Effekte von Chop sind Protein-Protein-Interaktionen (25).

Die essentielle Rolle des pro-apoptotischen BH3-*only* Proteins Bim im Rahmen der ER-Stress-induzierten Apoptose zeigten vor allem Puthalakath et al (99). Diese Gruppe konnte eine vermehrte Expression der Bim-mRNA sowie einen deutlichen Anstieg der Bim-

Proteinlevel in verschiedenen Zelltypen und als Reaktion auf verschiedene ER-Stress Induktoren, inkl. TP und TM, nachweisen. Des Weiteren zeigten sich Bim^{-/-}-Maus-Thymozyten deutlich widerstandsfähiger gegen TP- und TM-induzierte Apoptose. In der gleichen Arbeit wurden auch zwei wesentliche Regulationsmechanismen von Bim charakterisiert. Unter ER-Stress findet in vielen Zellen eine gleichsinnige Hochregulation von Chop und Bim statt. In dieser Studie wurde ein kausaler Zusammenhang einer transkriptionellen Regulation von Bim durch einen heterodimeren Chop-C/EBP α Transkriptionsfaktor gezeigt. Darüber hinaus induzierten sowohl TP als auch Wachstumsfaktorentzug in Maus-Thymozyten vom WT einen Anstieg der Bim-Proteinlevel, der in Chop^{-/-}-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Daraus schließen die Autoren, dass die Bim-Hochregulation unter diesen Einflüssen Chop-abhängig ist. Des Weiteren unterliegt Bim einer posttranslationalen Regulation durch die Protein-Phosphatase 2 A (PP2A). Die PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Bim im Rahmen von TP-induzierter Apoptose verhindert die Ubiquitylierung und proteasomale Degradation von Bim und erhöht somit das intrazelluläre Proteinlevel als Reaktion auf ER-Stress. Interessanterweise, besonders im Hinblick auf die Fragestellung in dieser Arbeit, konnte aber auch gezeigt werden, dass die Expression von Bim in PMN, im Gegensatz zu anderen Zellarten, auf Gen- und Proteinebene durch den pro-*survival* Faktor *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) induziert wird (105)(106). In Zusammenhang mit der Beobachtung, dass PMN von Bim^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu PMN vom Wildtyp nach GM-CSF Exposition eine deutlich effizientere Verzögerung der Apoptose zeigen, lässt sich daraus schließen, dass die GM-CSF abhängige Bim-Induktion die anti-apoptotische Wirkung von GM-CSF abschwächt und somit für die Beendigung einer Entzündungsreaktion relevant sein könnte (105).

Die Untersuchung der Bim-Genexpression nach TP und TM Exposition ergab deutliche Unterschiede zwischen PMN und HL-60 Zellen. In PMN führten weder TP noch TM zu der signifikanten Zunahme der Bim-Genexpression, die aufgrund der eindeutig vorbeschriebenen, pro-apoptotischen Funktion von Bim im ER-Stress Modell zu erwarten gewesen wäre. Erkennbar ist allenfalls eine Tendenz zur Zunahme, die erstaunlicherweise in *Respondern* noch am geringsten ausfällt und nur 2 h nach TP auftritt. In Einklang zu bringen ist dieser Befund vor dem Hintergrund der Arbeit von Puthalakath et al (99) andererseits mit unseren eigenen Untersuchungen der Chop-Expression, wenn man davon ausgeht, dass auch keine Chop-Akkumulation im Zellkern erfolgt ist. Wenn die Bim-Expression Chop-abhängig ist und keine deutliche Erhöhung der Chop-Proteinlevel in PMN nach TP und TM erfolgte, konnte auch keine Bim-Induktion erfolgen. 18 h nach TM hatten PMN allerdings eine signifikante Erhöhung des Chop-Proteinlevels gezeigt. Diese ist zwar mit der tendenziellen

Zunahme der Bim-Genexpression zum gleichen Zeitpunkt vereinbar, es scheint aber keinen ähnlich starken Zusammenhang zu geben wie im umgekehrten Fall, der Chop-Defizienz. Möglicherweise sind neben Chop weitere Faktoren für die Induktion von Bim erforderlich. Obwohl eine Untersuchungen der Bim-Proteinlevel notwendig wäre, und ein Beweis nur durch Untersuchungen an Chop- bzw Bim-defizienten Zellen erbracht werden kann, legen unsere Ergebnisse nahe, dass weder Chop noch Bim essentiell für ER-Stress-induzierte Apoptose in PMN sind, auch wenn dieser Zusammenhang für viele andere Zellarten gültig zu sein scheint. In HL-60 Zellen verhielt sich die Bim-Genexpression völlig konträr. Sowohl TP als auch TM führten nach 6 h zu einer signifikanten Verminderung der Bim-Genexpression, die sich nach TM auch noch nach 18 h nachweisen ließ. Anders als für Bip und Chop gab es hier keinerlei Vergleichbarkeit zwischen PMN und HL-60 Zellen. Auch in HL-60 Zellen ist keine Regulation der Chop-Proteinlevel gesehen worden, und Bim zeigt sich eher nicht für die von TP oder TM induzierte Zunahme der Apoptoserate verantwortlich.

Das anti-apoptotische BCL-2 Protein MCL-1 nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der PMN Apoptose ein. Die N-terminale Region von MCL-1 ist reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) (PEST-domain) und prädestiniert MCL-1 für eine schnelle proteasomale Degradation (107). Die daraus resultierende kurze HWZ gegenüber einer ständigen Neusynthese macht MCL-1 dabei zu einem idealen Target mit einer Art Schalterfunktion im Rahmen der Apoptose-Regulation. Maus PMN zeigen *in vivo* nach der Deletion von MCL-1 eine periphere Zellzahlreduktion um 80-90% durch vermehrte Apoptose (108), während viele *Survival*-Signale die MCL-1-Expression erhöhen (56) oder den MCL-1-Abbau reduzieren (57). Bereits 1998 fanden Moulding et al. einen Zusammenhang zwischen dem MCL-1-Level und einer zytokinvermittelt verlängerten Überlebensdauer von humanen PMN *in vivo* und zeigten eine Erhöhung der MCL-1-Proteinexpression durch GM-CSF-Behandlung (62). Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten eine positive Korrelation der MCL-1-Level mit der PMN-Überlebensdauer polytraumatisierter Patienten zeigen. Im Einklang mit anderen Studien (109)(110) konnte dabei ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang zwischen GM-CSF aus dem Patienten-Serum und der Zunahme der MCL-1-Proteinexpression in Patienten-PMN hergestellt werden. Des Weiteren war in der selben Studie in PMN von Traumapatienten das erhöhte MCL-1-Level mit einer Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und konsekutiver Hemmung der intrinsischen Apoptose durch verminderte Aktivierung von Caspase-9 assoziiert (86). In einer aktuellen Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der MCL-1 Stabilisierung in inflammatorischen PMN genauer untersucht (111). Die Ergebnisse

deuten darauf hin, dass eine Inhibition sowohl von Caspasen als auch von proteasomaler Degradation zum erhöhten MCL-1 Level in inflammatorischen PMN mit der daraus folgenden Resistenz gegenüber Staurosporin-vermittelter intrinsischer Apoptose beiträgt. Diese Staurosporin-Resistenz konnte bis mindestens Tag 10 nach Trauma nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Außerdem erfolgte in inflammatorischen, Apoptose-resistenten PMN, anders als in PMN von gesunden Spendern, keine Aktivierung von BAX und Bid und demnach auch keine Translokation der aktivierten Formen tBAX und tBid in die mitochondriale Fraktion, kein Austritt von Cytochrom C ins Zytosol und keine Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3. Auch in einem Tiermodell für akute Pankreatitis konnte die inverse Korrelation von MCL-1-Expression und Apoptoserate peripherer PMN gefunden werden, allerdings wurden die Grundlagen der MCL-1-Regulation in der entsprechenden Studie nicht weiter untersucht (95).

Unter TP- bzw. TM-induziertem ER-Stress konnte eine anti-apoptotische Rolle von MCL-1 in menschlichen Melanomzellen gezeigt werden. Dabei induzieren IRE1 α und ATF6 die MCL-1 Expression mit der Konsequenz einer erhöhten Überlebensrate (112)(113). In humanen multiplen Myelom-Zellreihen zeigten Hu et al. (114), dass Bortezomib-induzierter ER-Stress eine ATF4-abhängige MCL-1-Induktion bewirkt. Auch TM führte in diesen Zellen zu einem Anstieg sowohl der Gen- als auch der Proteinexpression von MCL-1, was die Annahme unterstreicht, dass die MCL-1-Induktion UPR-vermittelt war. In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom(NSCLC)-Zellen hingegen führte ER-Stress Induktion durch die Behandlung mit dem Folsäureantagonisten Pemetrexed über ATF4 zu einer vermehrten MCL-1-Degradation durch verminderte Deubiquitylierung, und zu vermehrter Apoptose (115). Dass Pemetrexed ER-Stress-induziert, leiten die Autoren dabei aus einer vorangegangenen Studie ab, in der Pemetrexed-Behandlung in NSCLC-Zellen die Bip-, Chop- und IRE1 α -Expression induziert hatte (116). Auch in Myoblasten führten TP und TM zu einer Reduktion der MCL-1-Proteinlevel und vermehrter Apoptose, am ehesten in einer ATF6 abhängigen Weise (117). Die Auswirkungen von ER-Stress auf die MCL-1-Level in PMN sind bisher nicht untersucht worden. Unsere Untersuchung der MCL-1-Proteinexpression in *Responder* PMN ergab eine signifikante Abnahme der MCL-1-Proteinlevel nach der Behandlung mit TP und TM, die nach TP deutlicher und früher (bereits nach 2 h) als nach TM (erst nach 6 h) ausfiel. Im Einklang mit den Ergebnissen sowohl unserer eigenen Arbeitsgruppe als auch mit denen anderer Arbeitsgruppen liegt somit eine inverse Korrelation des MCL-1 Levels mit der Apoptoserate vor. Unsere Untersuchung belegt eine solche Korrelation zum ersten Mal auch im Zusammenhang mit ER-Stress. Mögliche Ursachen für eine Abnahme des MCL-1-

Proteinlevels sind ein erhöhter proteasomaler Abbau und / oder die Spaltung des Proteins durch Caspasen (107)

Ein Defizit dieser Untersuchungen ist, dass sie sich auf Zellen mit Apoptoseantwort beschränkt, da es im Untersuchungszeitraum leider nicht gelungen ist, für diese Untersuchung Spender-PMN mit *non Responder*-Verhalten gegenüber TP zu akquirieren. Eine Untersuchung der MCL-1-Proteinexpression auch in *non Respondern* würde Aufschluss darüber geben, ob MCL-1 an diesem Phänomen beteiligt ist oder nicht. Generell wäre eine weiterführende Untersuchung der MCL-1-Regulation in PMN im Rahmen von ER-Stress erstrebenswert. Möglicherweise beruht die von uns festgestellte TP-Resistenz von PMN sowohl von Probanden als auch von Traumatpatienten auf einer erhöhten MCL-1 Expression. Weiterhin wird deutlich, dass MCL-1 offensichtlich nur an der Regulation der TP-induzierten Apoptose beteiligt zu sein scheint. Obwohl TM eine deutliche pro-apoptotische Wirkung in PMN zeigte, blieben die MCL-1 Level in diesen Zellen weitgehend stabil. In welchem Zusammenhang die MCL-1-Expression mit der TP-induzierten ER Stressantwort steht, ist jedoch Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Für die Exekution des apoptotischen Zelltods einschließlich ER-Stress-induzierter Apoptose sind Caspasen von essentieller Bedeutung. Am besten erforscht im Zusammenhang mit der ER-Stress-induzierten Apoptose ist die murine Caspase-12, die beim Menschen allerdings irrelevant zu sein scheint (30). Ein weiterer, wahrscheinlicher, wenn auch bisher deutlich weniger erforschter Kandidat für die Apoptose-Initiation ausgehend vom ER ist Caspase-4. Diese Vermutung stützt sich vor allem auf eine viel beachtete Arbeit von Hitomi et al. aus dem Jahr 2004 (31). Auf der Suche nach einer zu Caspase-12 möglichst homologen, humanen Caspase identifizierte diese Gruppe die Caspase-4, ebenfalls ein Mitglied der Caspase-1/ICE-Subfamilie (118). Die Lokalisation der Caspase-4 konnte sowohl in Neuroblastomzellen als auch in HeLa Zellen primär dem ER und in geringerem Umfang auch den Mitochondrien zugeordnet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Caspase-4 in diesen Zellen nach der Behandlung mit TP und TM gespalten wird, nicht aber nach der Behandlung mit alternativen Apoptose-Induktoren, wie Staurosporin oder UV-Licht, obwohl diese zu ähnlichen Apoptoseraten führten. Eine Ablation des mitochondrialen Weges durch Überexpression von BCL-2 beeinträchtigte die TM-abhängige Spaltung von Caspase-4 nicht, so dass diese Spaltung *upstream* der mitochondrialen Membrandepolarisation anzunehmen ist. Die Suppression der Caspase-4 Expression mittels siRNA in derselben Studie ergab eine erhöhte Resistenz gegenüber TP-induzierter Apoptose in beiden Zelltypen. Andere Gruppen zeigten eine Rolle von Caspase-4 unter anderem in Proteasomen-Inhibitor-induzierter Apoptose in humanen Pankreas-Krebszellen (119) und Multi-Kinase-Inhibitor-induzierter

Apoptose in humanen Leukämiezellen (120). Andererseits resultiert eine Inhibition von Caspase-4 generell nur in einer partiellen ER-Stress Resistenz, die Expression dieser Caspase ist nicht ubiquitär, und einige Zellen weisen in der Abwesenheit von Caspase-4 sogar keinerlei Einschränkung der ER-Stress-induzierten Apoptose auf (121)(122).

Im Einklang mit der Studie von Binet et al. (68) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass humane PMN Caspase-4 exprimieren. Auf der anderen Seite konnte hier aber keine signifikante ER-Stress abhängige Spaltung der Pro-Caspase-4 in ihre aktive Form nachgewiesen werden. Dabei ist zu beachten, dass Binet et al. nicht TP und TM zur ER-Stress Induktion angewendet haben, sondern Arstentrioxid (ATO). Widerum im Einklang mit unseren Befunden zeigte sich Caspase-4 aber entbehrlich für die ATO-induzierte Apoptose, da eine spezifische Inhibition mit dem Caspase-4-Inhibitor LEVD-fmk die Apoptoserate nach ATO nicht beeinflusste. Zusammenfassend scheint Caspase-4 in PMN keine tragende Rolle im Rahmen ER-Stress-induzierter Apoptose zu haben.

Ferner gibt es eine Reihe von Hinweisen für eine mitochondriale Beteiligung am ER-Stress-induzierten Apoptoseprozess (121), sodass beide Signalwege nicht unabhängig voneinander agieren. Mehrere Studien zeigen einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Cytochrom C Austritt bzw. Caspase 9-Aktivierung im Zusammenhang mit ER-Stress-induzierter Apoptose (123)(124)(125). Im Umkehrschluss führten auch ein Verlust von Apaf-1 oder eine Inhibition der mitochondrial permeability transition (MPT) zu einer Verminderung ER-Stress-induzierter Apoptose in verschiedenen Versuchsansätzen (121). Im Einklang mit diesem Konzept von einer Mitochondrienabhängigkeit der ER-Stress-induzierten Apoptose ergab unsere Untersuchung der mitochondrialen Membranpermeabilität in TP- bzw. TM-behandelten PMN eine signifikante Zunahme der Membranpermeabilität, was auf eine zunehmende Membrandepolarisation unter diesen Bedingungen hindeutet. Dabei trat die Permeabilitätserhöhung nach TP wesentlich früher auf als nach TM. Während 4 h nach TP-Behandlung bereits eine hoch-signifikante Permeabilitätserhöhung nachweisbar war, hatte die TM-Behandlung zum gleichen Zeitpunkt noch keinen signifikanten Effekt. Nach 18 h allerdings bewirkte auch TM einen deutlichen Verlust der mitochondrialen Membranstabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte im unterschiedlichen Wirkmechanismus von TP und TM liegen. Während TM primär die Proteinfaltung behindert und so zu einer UPR-Antwort im engeren Sinne führt, verändert TP sowohl den Ca^{2+} -Haushalt des ER als auch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Darüber hinaus ist es Konsens, dass eine Erhöhung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration maßgeblich zur MPT beiträgt, somit intrinsische Apoptose initiiert (126), und

dass dieser Vorgang u.a. eng mit dem ER-Status gekoppelt ist (127). Eine TP-induzierte Erhöhung der mitochondriennahen Ca^{2+} -Konzentration führt dabei am ehesten zu einem mitochondrialen Ca^{2+} -*Overload* mit konsekutiver Cytochrom C Freisetzung, die wiederum eine irreversible Öffnung MAM-assoziiierter Inositoltriphosphat-Rezeptor (IP_3R)- Ca^{2+} -Kanäle, und somit einen massiven Ca^{2+} -Transfer mit Amplifikation des apoptotischen Signals bewirkt (128)(129).

Die erhöhte mitochondriale Membranpermeabilität in apoptotischen Zellen nach TP und TM ging im Weiteren mit einer starken Erhöhung der Caspase-9 Aktivität und nachfolgend auch mit einer Erhöhung der Aktivität der Effektorcaspasen-3/-7 einher. Dabei ist zu beachten, dass die Erhöhung der Caspasenaktivitäten bereits nach 4 h nachgewiesen werden konnte, obwohl TM zu diesem Zeitpunkt noch keinen Effekt auf die mitochondriale Membranpermeabilität gezeigt hatte. Im Gegensatz zur TP-Behandlung blieb nach Behandlung der Zellen mit TM die Caspase-9 Aktivität auch zu späteren Zeitpunkten einschließlich nach 18 h signifikant erhöht. Der TM-induzierte pro-apoptotische Effekt scheint im Vergleich zu TP zeitversetzt aufzutreten was auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Substanzen zurückzuführen ist.

Ob auch eine Beteiligung der extrinsischen Apoptose besteht, ist von uns nicht untersucht worden und kann somit auch nicht ausgeschlossen werden. Eine ER-Stress assoziierte Caspase 8-Aktivierung wurde in MEF-Zellen nachgewiesen (125) und könnte theoretisch auch in PMN relevant sein.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass PMN und ausdifferenzierte, PMN-ähnliche HL60 Zellen nicht einheitlich auf ER Stress reagieren. Dies bedeutet zum einen, dass für derartige Untersuchungen HL-60 Zellen nicht als Modell für PMN Verwendung finden können. Zum anderen bestätigen die Versuche aus dieser Arbeit die Komplexität von primären PMN. Während die in HL-60 Zellen erzielten Ergebnisse in nachfolgenden Experimenten reproduziert werden konnten, zeigte sich bei den PMN eine starke Abhängigkeit vom Spender bzw. von dessen Immunstatus.

Es ist ferner zu bedenken, dass die Isolation und Analyse zirkulierender PMN nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf das Verhalten von PMN im entzündlichen Gewebe zulässt. Das dort vorherrschende Milieu und die Interaktion mit benachbarten Zellen könnten das Apoptoseverhalten von PMN massiv beeinflussen. Außerdem sind Patienten auf der Intensivstation vermutlich stark unterschiedlichen Umständen im Sinne von operativen Eingriffen und individueller Pharmakotherapie ausgesetzt. Insbesondere das Hypnotikum

Propofol könnte ebenfalls das Verhalten der von solchen Patienten isolierten PMN beeinflussen (130). Das Bild wird noch verkompliziert, indem jüngere Studien zeigen, dass z.B. durch tumorinduzierte Inflammation einerseits (131), oder experimentell induzierte systemische Inflammation andererseits (132), verschiedene PMN-Phänotypen entstehen, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Die gewonnenen Ergebnisse müssen also vor diesem Hintergrund betrachtet werden, liefern aber dennoch wichtige Hinweise zur Charakterisierung von PMN.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PMN von gesunden Probanden sowie polytraumatisierten Patienten auf eine Behandlung mit TM im Allgemeinen mit einer Zunahme der Apoptoserate reagieren, wohingegen einige Zellen, sowohl von gesunden Spendern als auch von polytraumatisierten Patienten, eine Apoptoseresistenz gegenüber TP entwickeln. Die hierfür verantwortlichen Mechanismen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht entschlüsselt werden. Die TP-induzierte Apoptoseantwort ging mit einer signifikanten Reduktion der MCL-1 Proteinlevel, einer Destabilisierung der mitochondrialen Membran und einer Aktivierung der Initiatorcaspase für intrinsische Apoptose (Caspase-9) und der Effektorcaspasen-3/-7 in PMN einher. Aufgrund beträchtlicher Unterschiede bzgl. des Apoptoseverhaltens auf TP sowie der Gen- und Proteinexpression im Kontext von TP- bzw. TM-induzierter Apoptose eignen sich ausdifferenzierte HL-60 Zellen nicht als ER-Stress Modell für die zukünftige Untersuchung ER-Stress-induzierter Apoptose in PMN.

5.1 Ausblick

Unsere Untersuchung des Apoptoseverhaltens von PMN polytraumatisierter Patienten deutet die Entwicklung einer TP-Resistenz im post-traumatischen Verlauf an. Um diesen Befund zu erhärten, und ggf. auch bei Patienten-PMN einen Zusammenhang mit der Grundapoptose zu erkennen, müssten weitere Patienten akquiriert und eine höhere Fallzahl generiert werden, so dass *Responder* und *non Responder* statistisch getrennt betrachtet werden können. Interessant wäre vor dem Hintergrund der weiteren Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit auch die Analyse der Bip-Expression in solchen Zellen, bzw. die Zeitkinetik, mit der Apoptosemerkmale in Relation zur Bip-Expression auftreten.

Obwohl die Versuche aus dieser Arbeit, anders als erwartet, keine Regulation des Gens für das pro-apoptotische BH3-*only* Protein Bim als Antwort auf ER-Stress zeigen konnten, wäre

eine Untersuchung der Proteinexpression zumindest nach TP noch interessant, da die Möglichkeit einer PP2A-abhängigen Proteinstabilisierung besteht.

Da wir eine deutliche Reduktion der MCL-1-Proteinexpression in *Responder* PMN gesehen haben, wäre eine Untersuchung der MCL-1-Level in *non Respondern* hilfreich, um die Bedeutung von MCL-1 im Rahmen ER-Stress-induzierter Apoptose in PMN besser zu verstehen. Da außerdem eine Regulation der MCL-1-Genexpression im Rahmen von ER-Stress in anderen Zelltypen beschrieben worden ist, würde möglicherweise auch eine Untersuchung der MCL-1-Genexpression weiteren Aufschluss über die MCL-1-Regulation in PMN geben.

Interessant wäre auch die Untersuchung von Membranpermeabilität und Caspasen-Aktivität in *non Respondern*. Solche Versuche könnten aufzeigen, ob es sich bei der TP-Resistenz um eine intrinsische Apoptoseresistenz handelt oder nicht.

Ebenfalls interessant ist die Frage nach einer Beteiligung des extrinsischen Weges, bzw. einer Aktivierung von Caspase-8 an ER-Stress-induzierter Apoptose.

Letztendlich haben unsere Untersuchungen der Gen- und Proteinexpression, abgesehen von der deutlichen MCL-1 Reduktion, keine schlüssigen Hinweise für eine Erklärung des Apoptoseverhaltens von PMN nach TP und TM geliefert. Weiterführende Überlegungen sollten vor allem in zwei Richtungen führen:

- 1) UPR-Zweige, die von uns nicht untersucht wurden
- 2) Ca²⁺-abhängige Mechanismen der Apoptoseinduktion.

Die UPR ist ein überaus komplexes System der Informationsverarbeitung und funktioniert Zell- und Kontextspezifisch. Die drei UPR-Arme werden von verschiedenen Zellen selektiv genutzt und nicht jede Zelle ist auf alle Arme der UPR angewiesen. Des Weiteren beeinflussen Art und Intensität des Stimulus den Verlauf der UPR und entscheiden über Überleben oder Apoptose. UPR und ER-Stress assoziierte Apoptose sind Themen von größtem Forschungsinteresse, und es ergeben sich kontinuierlich neue Erkenntnisse zu Interaktionen und Effektormechanismen der verschiedenen Komponenten dieses Systems. Ein umfassendes Verständnis ER-Stress-induzierter Apoptose ist noch in weiter Ferne, und speziell im Hinblick auf PMN steht die Aufklärung solcher Zusammenhänge komplett am Anfang. Es wird also zunächst wichtig sein zu erfahren, wie die drei Ausgangspunkte der UPR, IRE1 α , PERK und ATF6 in PMN als Reaktion auf ER-Stress reguliert werden und welche downstream-Effekte sie möglicherweise katalysieren. Dazu bietet sich die Untersuchung weiterer etablierter *Player* im ER-Stress-Apoptose-System an: eIF2 α , XBP1,

ATF4, *apoptosis-signal-regulating kinase 1* (ASK1), cJUN N-terminalen Kinasen (JNKs), Noxa, Puma, Bid, BAX, und BAK.

Ein konkreter Ansatz, der sich aus dieser Arbeit ableitet, ist die weiterführende Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase in PMN im Kontext von TP-induzierter Apoptose. Unsere Ergebnisse lassen einen Mechanismus der TP-Resistenz vermuten, der nicht individuell sondern eher situativ ist. Es scheint eine Vorbedingung zu geben, die sowohl PMN von gesunden Probanden als auch PMN von Patienten zu manchen Zeitpunkten resistent gegen TP-induzierte Apoptose macht. Aufgrund des Wirkmechanismus von TP, und der bekannten, räumlichen wie funktionalen Interaktion von ER und Mitochondrien, vor allem im Hinblick auf den Ca^{2+} -Austausch zwischen den beiden Organellen, der ab einem gewissen Ausmaß zur mitochondrialen Depolarisation mit konsekutiver Apoptose führt, ist die Erklärung für dieses Phänomen möglicherweise in diesem Bereich zu finden. Denkbar wäre beispielsweise, dass bei vorbestehenden, sehr niedrigen luminalen Ca^{2+} -Konzentrationen im ER die TP-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nicht ausreicht, um den mitochondrialen Ca^{2+} -*Overload* zu erzeugen. Dies müsste sich z.B. bei *non Respondern* in einem Ausbleiben der mitochondrialen Depolarisation nach TP-Behandlung widerspiegeln. Vor diesem Hintergrund wird es auch interessant sein, den für andere Zellen beschriebenen Einfluss von *BAX inhibitor 1* (BI1) und von Proteinen der BCL-2-Familie auf die Ca^{2+} -Konzentration im ER zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239–57.
2. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012 Dec;45(6):487–98.
3. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986 Mar 28;44(6):817–29.
4. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305–8.
5. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995 Nov 15;14(22):5579–88.
6. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
7. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jan;15(1):49–63.
8. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727–30.
9. Yu X, Acehan D, Ménétret J-F, Booth CR, Ludtke SJ, Riedl SJ, et al. A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Struct Lond Engl* 1993. 2005 Nov;13(11):1725–35.
10. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):43–53.
11. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):613–21.
12. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491–501.
13. Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbar U, Huang DCS, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 2009 Aug 20;460(7258):1035–9.
14. McCracken AA, Brodsky JL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol*. 1996 Feb;132(3):291–8.
15. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Dec;7(12):1013–30.
16. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*. 2002 Nov 15;110(10):1389–98.
17. Cox JS, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):391–404.
18. Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(3):921–32.
19. Todd DJ, Lee A-H, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):663–74.
20. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):271–4.

21. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001 Dec 28;107(7):881–91.
22. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*. 1998 Oct 1;17(19):5708–17.
23. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000 May;5(5):897–904.
24. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, et al. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*. 2007 Sep;13(3):351–64.
25. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2003 Dec 19;11(4):381–9.
26. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998 Apr 1;12(7):982–95.
27. Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res*. 2001 Jul 15;267(2):193–204.
28. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a008656.
29. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008;27(48):6194–206.
30. Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Apr;23(2):143–9.
31. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*. 2004 May 10;165(3):347–56.
32. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):897–907.
33. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth CJ, Mehal WZ, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*. 2006 Feb 10;311(5762):847–51.
34. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1545–56.
35. Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S, Bauer C, editors. *Physiologie: [ideal für die neue AO] ; zahlreiche Tabellen. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005. 930 p.*
36. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010 Jan 8;31(8):318–24.
37. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, et al. LEUKOKINETIC STUDIES. IV. THE TOTAL BLOOD, CIRCULATING AND MARGINAL GRANULOCYTE POOLS AND THE GRANULOCYTE TURNOVER RATE IN NORMAL SUBJECTS*. *J Clin Invest*. 1961 Jun;40(6):989–95.
38. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil Priming: Pathophysiological Consequences and Underlying Mechanisms. *Clin Sci*. 1998 May 1;94(5):461–71.
39. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011 Oct;32(10):452–60.
40. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159–75.
41. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):349–61.

42. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
43. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 Feb 9;320(6):365–76.
44. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):285–94.
45. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How neutrophils shape adaptive immune responses. *Immunol Mem*. 2015;471.
46. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014 Jul 31;124(5):710–9.
47. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):871–82.
48. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989 Mar;83(3):865–75.
49. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):173–82.
50. Kirschnek S, Vier J, Gautam S, Frankenberg T, Rangelova S, Eitz-Ferrer P, et al. Molecular analysis of neutrophil spontaneous apoptosis reveals a strong role for the pro-apoptotic BH3-only protein Noxa. *Cell Death Differ*. 2011 Nov;18(11):1805–14.
51. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*. 2001 Jan 5;487(3):318–22.
52. Simon H-U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev*. 2003 Jun 1;193(1):101–10.
53. Fecho K, Cohen PL. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1998 Sep;64(3):373–83.
54. Watson RW, O'Neill A, Brannigan AE, Brannigan AE, Coffey R, Marshall JC, et al. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett*. 1999 Jun 18;453(1–2):67–71.
55. Brown SB, Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Jan 1;162(1):480–5.
56. Geering B, Simon H-U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*. 2011 Sep;18(9):1457–69.
57. McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*. 2014;7:15–23.
58. El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β 2 Integrins. *Front Immunol [Internet]*. 2013 Mar 6 [cited 2016 Mar 3];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589696/>
59. Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR, Edwards SW. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001 Nov;70(5):783–92.
60. Tsuchida H, Takeda Y, Takei H, Shinzawa H, Takahashi T, Sendo F. In vivo regulation of rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF-alpha or cycloheximide. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 Mar 1;154(5):2403–12.
61. Santos-Beneit AM, Mollinedo F. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):712–24.
62. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2495–502.

63. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 Family Reunion. *Mol Cell*. 2010 Feb 12;37(3):299–310.
64. Bouillet P, Metcalf D, Huang DCS, Tarlinton DM, Kay TWH, Köntgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte Homeostasis, and to Preclude Autoimmunity. *Science*. 1999 Nov 26;286(5445):1735–8.
65. Villunger A, Scott C, Bouillet P, Strasser A. Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2393–400.
66. Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW, Kaufmann SH, et al. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):674–85.
67. Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RWG, Martin SJ. The Apoptosome Pathway to Caspase Activation in Primary Human Neutrophils Exhibits Dramatically Reduced Requirements for Cytochrome c. *J Exp Med*. 2003 Mar 3;197(5):625–32.
68. Binet F, Chiasson S, Girard D. Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):18–23.
69. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007 Feb;21(2):325–32.
70. O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol*. 2000 Jul;68(1):15–20.
71. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Dec;156(6):1969–77.
72. Ertel W, Keel M, Infanger M, Ungethüm U, Steckholzer U, Trentz O. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J Trauma*. 1998 May;44(5):767-775; discussion 775-776.
73. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee C-Y, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R120.
74. El Kebir D, József L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res*. 2008 Aug 15;103(4):352–9.
75. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):890–8.
76. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 Dec 19;420(6917):846–52.
77. Berchtold R, Bruch H-P, Keller R, editors. *Chirurgie: mit 335 Tabellen und 343 Praxisfragen*; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. 6., aktualisierte Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. 1280 p.
78. Tsukamoto T, Chanthaphavong RS, Pape H-C. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*. 2010 Jan;41(1):21–6.
79. Robertson CM, Coopersmith CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect*. 2006 Apr;8(5):1382–9.
80. Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, et al. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit Care Med*. 1995 Mar;23(3):474–80.
81. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury

- neutrophil priming and activation: An early vulnerable window. *Surgery*. 1995 Aug 1;118(2):358–65.
82. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM. Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma*. 1995 Sep;39(3):411–7.
83. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
84. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*. 1998 Nov;26(11):1793–800.
85. Biffl WL, Moore EE, Zallen G, Johnson JL, Gabriel J, Offner PJ, et al. Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure. *Surgery*. 1999 Aug;126(2):198–202.
86. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, et al. Mcl-1-Mediated Impairment of the Intrinsic Apoptosis Pathway in Circulating Neutrophils from Critically Ill Patients Can Be Overcome by Fas Stimulation. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6198–206.
87. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med*. 2004 Jul;32(7):1460–9.
88. BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer - Features - System [Internet]. [cited 2017 Aug 14]. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/br/instruments/facscalibur/features/index.jsp>
89. Caspase-Glo® 3/7 Assay Protocol [Internet]. [cited 2017 Sep 6]. Available from: <https://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-37-assay-protocol/>
90. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005 Apr;35(4):373–81.
91. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2013 Dec;1833(12):3460–70.
92. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*. 1996 Aug;16(8):4273–80.
93. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Sep;11(9):2307–16.
94. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Mori K, Shino M, Sakakura K, et al. Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in patients with tongue cancer. *Neoplasma*. 2016;63(4):588–94.
95. Xu L-T, Xu H-L, Fu M-S. Association between glucose-regulated protein and neutrophil apoptosis in severe acute pancreatitis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Aug 1;8(8):9300–6.
96. Lu PD, Harding HP, Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol*. 2004 Oct 11;167(1):27–33.
97. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis. *Mol Cell*. 2001 Jun 1;7(6):1165–76.
98. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003 Mar;11(3):619–33.

99. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1337–49.
100. McCullough KD, Martindale JL, Klotz L-O, Aw T-Y, Holbrook NJ. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb 15;21(4):1249–59.
101. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation*. 2010 Jul 27;122(4):361–9.
102. Li T-T, Jia L-X, Zhang W-M, Li X-Y, Zhang J, Li Y-L, et al. Endoplasmic reticulum stress in bone marrow-derived cells prevents acute cardiac inflammation and injury in response to angiotensin II. *Cell Death Dis*. 2016 Jun 9;7(6):e2258.
103. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*. 1996 May 31;272(5266):1347–9.
104. Masciarelli S, Fra AM, Pengo N, Bertolotti M, Cenci S, Fagioli C, et al. CHOP-independent apoptosis and pathway-selective induction of the UPR in developing plasma cells. *Mol Immunol*. 2010 Mar;47(6):1356–65.
105. Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF, Simon HU. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ*. 2009 May 1;16(9):1248–55.
106. Cowburn AS, Summers C, Dunmore BJ, Farahi N, Print CG, Cook SJ, et al. GM-CSF CAUSES A PARADOXICAL INCREASE IN THE BH3-ONLY PRO-APOPTOTIC PROTEIN BIM IN HUMAN NEUTROPHILS. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Jun;44(6):879–87.
107. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*. 2010 Jul 16;584(14):2981–9.
108. Dzhagalov I, St. John A, He Y-W. The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1620–6.
109. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26915–21.
110. Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, et al. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Jun 15;166(12):7486–95.
111. Hornstein T, Lehmann S, Philipp D, Detmer S, Hoffmann M, Peter C, et al. Staurosporine resistance in inflammatory neutrophils is associated with the inhibition of caspase- and proteasome-mediated Mcl-1 degradation. *J Leukoc Biol*. 2016 Jan;99(1):163–74.
112. Jiang CC, Lucas K, Avery-Kiejda KA, Wade M, deBock CE, Thorne RF, et al. Up-regulation of Mcl-1 Is Critical for Survival of Human Melanoma Cells upon Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Res*. 2008 Aug 15;68(16):6708–17.
113. Dong L, Jiang CC, Thorne RF, Croft A, Yang F, Liu H, et al. Ets-1 mediates upregulation of Mcl-1 downstream of XBP-1 in human melanoma cells upon ER stress. *Oncogene*. 2011 Aug 25;30(34):3716–26.
114. Hu J, Dang N, Menu E, Bryune ED, Xu D, Camp BV, et al. Activation of ATF4 mediates unwanted Mcl-1 accumulation by proteasome inhibition. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):826–37.
115. Yan J, Zhong N, Liu G, Chen K, Liu X, Su L, et al. Usp9x- and Noxa-mediated Mcl-1 downregulation contributes to pemetrexed-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death Dis*. 2014 Jul 3;5(7):e1316.
116. Su L, Liu G, Hao X, Zhong N, Zhong D, Liu X, et al. Death Receptor 5 and cellular FLICE-inhibitory protein regulate pemetrexed-induced apoptosis in human lung cancer cells.

- Eur J Cancer. 2011 Nov;47(16):2471–8.
117. Morishima N, Nakanishi K, Nakano A. Activating Transcription Factor-6 (ATF6) Mediates Apoptosis with Reduction of Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (Mcl-1) Protein via Induction of WW Domain Binding Protein 1. *J Biol Chem*. 2011 Oct 7;286(40):35227–35.
 118. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999 Nov;6(11):1028–42.
 119. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, Boise LH, Chiao PJ, Huang P, et al. Bortezomib Inhibits PKR-Like Endoplasmic Reticulum (ER) Kinase and Induces Apoptosis via ER Stress in Human Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11510–9.
 120. Rahmani M, Davis EM, Crabtree TR, Habibi JR, Nguyen TK, Dent P, et al. The Kinase Inhibitor Sorafenib Induces Cell Death through a Process Involving Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Cell Biol*. 2007 Aug 1;27(15):5499–513.
 121. Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene*. 2008;27(50):6419–33.
 122. Obeng EA, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29578–87.
 123. Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, et al. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*. 2000 May 4;19(19):2286–95.
 124. Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HLA, Kroemer G. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ*. 2002 Apr;9(4):465–7.
 125. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, et al. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res*. 2003 Feb 15;283(2):156–66.
 126. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):552–65.
 127. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6407–18.
 128. Raturi A, Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2013 Jan;1833(1):213–24.
 129. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2003 Dec;5(12):1051–61.
 130. Hsing C-H, Chen C-L, Lin W-C, Lin C-F. Propofol Treatment Inhibits Constitutive Apoptosis in Human Primary Neutrophils and Granulocyte-Differentiated Human HL60 Cells. *PloS One*. 2015;10(6):e0129693.
 131. Benarafa C. Tumor-induced inflammation alters neutrophil phenotype and disease progression. *Breast Cancer Res BCR* [Internet]. 2015 [cited 2016 Oct 29];17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594963/>
 132. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 2010 Jul 1;88(1):211–20.

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

16.12.2016, Susanne Detmer

