

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Subletale Apoptose – Beitrag mitochondrialer Signalwege
zur Entzündungsreaktion

Von Noëmi Sophia Ingeborg Ortmann

Aus Freiburg im Breisgau

München 2024

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner

Angefertigt am:

Universitätsklinikum Freiburg

Institut für Mikrobiologie und Hygiene

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Georg Häcker

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 06.07.2024

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Apoptose	3
1.1.	Extrinsischer Signalweg.....	4
1.2.	Intrinsischer Signalweg.....	5
1.3.	Pro- und anti-apoptotische Proteine.....	7
2.	Subletale Apoptose (<i>Minority MOMP</i>).....	7
3.	Inhibitoren von Komponenten der Zelltodsignalwege.....	8
3.1.	BH3-Mimetika	8
3.2.	pan-Caspasen-Inhibitoren	9
3.3.	Inhibitor der Nekroptose	9
4.	DNA-Schaden und γ H2AX als Marker.....	10
5.	NF- κ B-Signalweg	11
5.1.	Klassischer/kanonischer NF- κ B-Signalweg	12
5.2.	Alternativer/nicht kanonischer NF- κ B-Signalweg.....	13
6.	MAP-Kinasen.....	14
6.1.	ERK1/2-Aktivierungskaskade	15
6.2.	p-38-Aktivierungskaskade	15
6.3.	SAPK/JNK-Aktivierungskaskade.....	16
6.4.	Verbindung zwischen MAP-Kinasen und Apoptose	17
7.	Immunsystem	18
7.1.	Chemokine und Zytokine.....	19
7.2.	Zellen der angeborenen Immunabwehr.....	20
7.2.1.	Myeloide Zellen	20
7.2.2.	Neutrophile Granulozyten.....	20
7.2.3.	Monozyten	21
7.2.4.	<i>Innate lymphoid cells</i> (ILC)	22
7.2.5.	Natürliche Killerzellen	23
7.3.	Zellen der adaptiven Immunabwehr.....	23
7.3.1.	T- und B-Lymphozyten.....	23
8.	Pathogene	24
8.1.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	24
8.2.	<i>Chlamydia muridarum</i>	26

8.2.1.	Entwicklungszyklus der Chlamydien.....	26
8.2.2.	Immunreaktion auf Chlamydieninfektion.....	28
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Material	29
1.1.	Geräte und Gebrauchsgegenstände	29
1.2.	Zelllinien	30
1.3.	Bakterien	32
1.4.	Antibiotika	32
1.5.	Antikörper	33
1.5.1.	Primäre Antikörper	33
1.5.2.	Sekundäre Antikörper	34
1.5.3.	Antikörper für Immunzellfärbung (FACS Fortessa™).....	34
1.6.	Kommerzielle KITS.....	36
1.7.	Mäuse	36
1.8.	Primer für Genotypisierung der Mäuse.....	37
1.9.	Primer für RT-qPCR	37
1.10.	Puffer und Lösungen.....	37
1.11.	Medien und Zusatzstoffe für Zellkultur	40
1.12.	Chemikalien und Reagenzien.....	40
1.13.	Computerprogramme	43
2.	Methoden	44
2.1.	Zellbiologische Methoden.....	44
2.1.1.	Kultivierung diverser Zelllinien.....	44
2.1.2.	Einfrieren von Zellen	44
2.1.3.	Auftauen von Zellen.....	44
2.1.4.	Stimulation der Zellen mit Inhibitoren.....	45
2.1.5.	Herstellung von Zelllysaten in 1x Laemmli-Puffer	45
2.1.6.	<i>Enzyme-Linked Immunsorbent Assay (ELISA)</i>	46
2.2.	Mikrobiologische Methoden	46
2.2.1.	<i>In vitro</i> Salmonelleninfektion	46
2.2.2.	<i>In vivo Chlamydia muridarum</i> Infektion	47
2.3.	Proteinbiochemische Methoden	47
2.3.1.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)	47
2.3.2.	Western Blot	48
2.3.3.	Immundetektion durch spezifische Antikörper	48
2.4.	Genotypisierung der Mäuse	49
2.5.	RNA-Isolation aus dem Genitaltrakt.....	49

2.6.	Umschreiben der RNA in cDNA	50
2.7.	RT-qPCR zur Messung von Chemokinen.....	50
2.8.	RT-qPCR zum Nachweis von <i>C. muridarum</i>	51
2.9.	Nachweis von <i>C. muridarum</i> aus vaginalem Abstrich	52
2.9.1.	Infektion der HeLa-Zellen mit <i>C. muridarum</i> aus dem Abstrich.....	52
2.9.2.	Immunfluoreszenzfärbung der Einschlüsse von <i>C. muridarum</i>	53
2.9.3.	Berechnung der IFU/mL	53
2.10.	Isolation der Immunzellen aus dem murinen Genitaltrakt.....	53
2.11.	Durchflusszytometrie	54
2.11.1.	Oberflächenfärbung der Immunzellen	54
2.11.2.	Intrazelluläre Färbung der Immunzellen.....	55
2.11.3.	Zählung der isolierten Immunzellen	55
2.11.4.	Messung der Immunzellen via FACS Fortessa™ und Auswertung mittels FlowJo	56
2.11.5.	Aktive Caspase-3-Färbung der HeLa-Zellen	58
2.12.	Statistische Datenauswertung	59
IV.	ERGEBNISSE	60
1.1.	Auswirkung des Apoptosesignalwegs auf die Zytokinsekretion	60
1.2.	Rolle der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak in der Regulation der Zytokinsekretion nach Aktivierung des subletalen Apoptosesignalwegs.....	65
1.3.	Kinetik der Zytokinsekretion unter Berücksichtigung einzelner pro-apoptotischer Proteine	70
1.4.	Beteiligung der MAP-Kinasen am subletalen Apoptosesignalweg	73
1.5.	Der NF-κB-Signalweg spielt keine messbare Rolle für die IL-6-Sekretion	77
1.6.	Aktivierung von Caspase-3 und Zytokinsekretion nachfolgend der Mitochondrienaktivierung nach subletalen Apoptose-Stimuli (I).....	79
1.7.	Aktivierung von Caspase-3 und Zytokinsekretion nachfolgend der Mitochondrienaktivierung nach subletalen Apoptose-Stimuli (II)	83
1.8.	Die Zytokinsekretion erfolgt im Salmonellen-Infektionsmodell unabhängig von Bax und Bak.....	86
1.9.	Smac-abhängige Immunzellrekrutierung.....	89
1.10.	Smac-abhängige Chemokinexpression	94
1.11.	Erhöhte Chlamydienlast in Smac-defizienten Mäusen	97
V.	DISKUSSION	99
1.	Unterschiedliche Signalwege resultieren in der IL-8-/CXCL-1- und Il-6-Sekretion	100

2.	Unterschiede zwischen den BH3-Mimetika ABT-737 und S63845	105
3.	Unterschiede zwischen den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak	108
4.	Involvierung weiterer Signalwege in die Zytokinsekretion	110
4.1.	Der NF- κ B-Signalweg spielt auf Transkriptionsebene keine nachweisbare Rolle für die IL-6-Sekretion nachfolgend subletaler Stimuli	110
4.2.	Bax/Bak-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen nach S63845-Behandlung	111
5.	Verbindung zwischen subletaler Aktivierung des Apoptosesystems und dem Immunsystem im Rahmen von Infektionsmodellen	113
5.1.	Bax/Bak-unabhängige Zytokinsekretion nach Infektion mit <i>Salmonella Typhimurium</i>	113
5.2.	Smac-abhängige Immunzellrekrutierung während <i>C. muridarum</i> Infektion	115
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	118
VII.	SUMMARY	120
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	122
IX.	ANHANG	145
1.1.	Ergebnistabelle der Apoptose-assoziierten Zelllinien bzgl. der Zytokinsekretion/Caspase-3-Aktivierung nach Inhibitorbehandlung	145
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	148
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	149
XII.	DANKSAGUNG	150

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A1	<i>Bcl-2 like protein A1</i>
Ala	Alanin
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-cyanin7
APO	<i>Apoptosis antigen</i>
ASK	<i>Apoptosis signal-regulated kinase</i>
ATF-1	<i>Activating transcription factor 1</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated kinase</i>
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
BAFFR	<i>B-cell activating factor receptor</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-w	<i>Bcl-2 like protein 2</i>
Bcl-X _L	<i>B-cell lymphoma gene x (long form)</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i>
BH	Bcl-2 Homologiedomäne
BH3-only	<i>B-cell homology domain 3 only</i>
Bid	<i>BH3-interacting death domain agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
Bmf	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
Bok	<i>Bcl-2 ovarian killer</i>
BSA	Rinderalbumin
bspw.	beispielsweise
<i>C. muridarum</i>	<i>Chlamydia muridarum</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>
CCL	CC-Chemokinligand

CCR2	CC-Chemokinrezeptor Typ 2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGAMP	<i>cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cyclic GMP AMP synthase</i>
Chk 1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
cNK	<i>conventional NK</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTCF	<i>Corrected total cell fluorescence</i>
CTRL	Kontrolle
CX3CR1	C-X3-C Chemokinrezeptor 1
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d	<i>days (Tage)</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low pl</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>Days post infectionem</i>
DR4	<i>Death receptor 4</i>
dscGFP	destabilisiertes GFP
DTT	Dithiothreitol
EB	<i>Elementary body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Elk-1	<i>ETS transcription factor ELK1</i>
Eomes	Eomesodermin
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FGT	<i>Female genital tract</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	<i>Hour(s) (Stunde)</i>
HBP1	<i>HMG box-containing protein 1</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HeLa	Henrietta Lacks
Hrk	Harakiri
i. allg	In der Regel allgemein
ICAD	<i>Inhibitor of apoptosis activating DNase</i>
IFN	Interferon
IFU	<i>Inclusion forming unit</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
Ile	Isoleucin
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
I κ B kinase (IKK)	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
Lin	<i>Lineage</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT β R	<i>Lymphotoxin-β receptor</i>
Ly-6C	<i>Lymphocyte antigen 6C</i>
M	<i>Microfold</i>
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase

MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant proteins</i>
MDA5	Melanom-Differenzierungantigen 5
MEK	MAP/Erk-Kinase
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MKK	MAP2K
mL	Milliliter
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MOMP	<i>Mitochondria outer membrane permeabilization</i>
mtDNA	<i>mitochondriale DNA</i>
MVA	<i>Modified vaccinia virus</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NGF	<i>Nerve-growth-factor</i>
NK	<i>Natural killer cell</i>
NK1.1	<i>Natural killer receptor</i>
nM	Nanomolar
Noxa	Lat. „Schaden“
NR4A1	<i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member</i>
Ø	Durchschnittlich
OmcB	<i>Large cysteine-rich periplasmic protein</i>
OMM	Äußere Mitochondrienmembran
p	Signifikanzniveau
p.i.	post infectionem
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PARL	<i>Presenelin-associated-rhomboid like protease</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin

PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cyanine5.5
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	Potential des Wasserstoffs
PmpD	Polymorphic membrane protein family
Pro	Prolin
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Q-VD-OPh	Chinoly-l-valyl-O-methylaspartyl-[2,6-difluorphenoxy]-methylketon
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RB	<i>Reticulate body</i>
Rel	<i>Rel-associated protein</i>
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen-I
RIPK1	<i>Receptor-interacting protein kinase 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Gibco Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR</i>
s.u.	siehe unten
SCV	<i>Salmonella containing vacuole</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sek	Sekunden
SEM	<i>Standard error of mean</i>
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SPG	Sucrose-Phosphat-Glutamat
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor TBX21</i>

T.n.I.	Tage nach Infektion
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TAB	<i>TAK-binding protein</i>
TAD	<i>transcriptional activating domain</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TH	T-Helferzellen
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR-1	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1</i>
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TREM	<i>Triggering receptors expressed on myeloid cells</i>
trNK	<i>Tissue-resident NK</i>
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
v. Chr.	vor Christus
Val	Valin
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X chromosome-linked IAP</i>
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat Fluoromethylketon
γ H2AX	Gamma Histon H2AX
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter

I. EINLEITUNG

Die Vorstellung eines „programmierten Zelltods“, heute eher als „regulierter“ Zelltod bezeichnet geht, wenn auch mechanistisch vage, über hundert Jahre zurück. Apoptose wurde 1972 als Begriff geprägt (1); damals wurde erstmals die einheitliche Morphologie von Zellen, die in verschiedenen Situationen starben, als Ausdruck eines aktiven Signalwegs interpretiert, der in verschiedenen Situationen aktiv ist (1). Die Apoptose tritt während der Ontogenese, des Alterns und der Aufrechterhaltung von Zellpopulationen in Geweben auf; eine weitere Funktion der Apoptose ist die Abwehr von schädlichen Einflüssen, u. a. Infektionen (2). Im Jahr 2015 beschrieben Ichim *et. al* eine zellbiologisch neue Beobachtung: Signale im mitochondrialen Apoptoseweg können auch eine subletale Form annehmen (3). Lange Zeit wurde die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) als „*point of no return*“ in der Apoptosesignaltransduktion angesehen (4, 5). Ichim und Kollegen zeigten, dass Zellen auch nur einen reduzierten/limitierten MOMP-Prozess und nachfolgend eine verminderte Caspasenaktivierung haben können (3). Im Gegensatz zur Apoptose (6, 7) ist die subletale Aktivierung des Apoptosesystems immunologisch aktiv. Unsere Gruppe hat gezeigt, dass diese subletalen Vorgänge während Infektionen auftreten, und dass diese niedriggradige Aktivierung des Apoptosesignalwegs entzündliche Aktivität hat: Infizierte Epithelzellen sezernieren eine Reihe von inflammatorischen Zytokinen (8). Diese Daten führen zu einer Reihe von Fragen, insbesondere der physiologischen Funktion und der Regulation der molekularen Abläufe dieser Signale. Die Ergebnisse zeigen eine Interaktion der Signalwege der (subletalen) Apoptose und der angeborenen Immunität. Rezeptoren der angeborenen Immunität – die Pathogene erkennen – müssen beteiligt sein, und apoptotische Signale müssen mit den wichtigen Wegen der angeborenen Immunität verknüpft sein, wie den Wegen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) oder des Nuklearfaktors Kappa B (NF- κ B) (9).

Damit bieten sich zwei Anknüpfungspunkte, die in dieser Arbeit benutzt wurden. Einerseits wurden die Signale analysiert, die von Mitochondrien nach chemischer Stimulation mit Bcl-2-Familienantagonisten ausgelöst werden. Andererseits wurden Experimente mit zwei Pathogenen durchgeführt, um die von den Bakterien ausgelösten Signale zu verstehen: *Salmonella Typhimurium* ist als Durchfallerreger

ein wichtiges Pathogen des Menschen. Chlamydien zählen weltweit zu den wichtigsten Vertretern von sexuell übertragbaren Krankheiten, und eine Infektion resultiert nicht selten in pathologische Schäden.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Hauptziele formuliert:

- 1.) Verständnis der Signaltransduktion durch ausgewählte Komponenten des Apoptoseapparates hinsichtlich Zytokinsekretion und (subletaler) Caspasenaktivierung. Dafür wurden unter anderem Bcl-2-Antagonisten/BH3-Mimetika zur Generierung subletaler, pro-apoptischer Stimuli eingesetzt.
- 2.) Identifikation von Signalwegen, die in die Sekretion von Zytokinen münden. Auch hier wurde wesentlich mit Bcl-2-Antagonismus gearbeitet.
- 3.) Verständnis der Rolle des mitochondrialen Proteins Smac, einer Komponente des Apoptosewegs, während einer Infektion der Maus mit *Chlamydia muridarum*. Unsere Gruppe hatte Smac als einen Mediator der Entzündung identifiziert, und hier sollten Effekte des Smac-Verlusts in der Maus getestet werden.

Die Arbeit befasst sich also mit einem Aspekt der zellbiologischen und immunologischen Grundlagenforschung, der u. a. für die Veterinärmedizin erhebliche Bedeutung hat.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Apoptose

Ein wichtiger Beitrag für das heutige Verständnis des programmierten Zelltods war die Studie von Kerr, Wylie und Currie, die morphologische Veränderungen in Zellen definierte, die unter physiologischen Bedingungen sterben und dadurch Hinweise auf konservierte Abläufe in einer sterbenden Zelle lieferten (1). Die am besten beschriebene Form des regulierten Zelltods stellt die Apoptose dar. Sie trägt unter anderem zum Erhalt der Gewebemöostase bei, indem die Elimination von bestimmten Zellen durchgeführt wird. Es sind außerdem noch weitere Formen des regulierten Zelltods beschrieben worden (10, 11, 12). Es wird u.a. zwischen Nekroptose, Pyroptose, Ferroptose und Apoptose unterschieden (13). Die Apoptose ist auch als Abwehrmechanismus bei Immunreaktionen oder der Schädigung von Zellen durch Krankheiten oder Schadstoffen beteiligt (2). Des Weiteren spielen Zelltod-Mechanismen eine Rolle bei der Beseitigung von intrazellulären Pathogenen. Viele Viren und Bakterien haben Strategien entwickelt, um die Apoptose von Wirtszellen auszulösen oder zu inhibieren. Die Blockierung der Apoptose der Wirtszelle in frühen Stadien der Infektion bietet den Viren Zeit für die Replikation und Assemblierung (Zusammenbau der Viruspartikel) (14, 15). Wenn die Apoptose generell gestört ist, kann dies zu ungebremstem zellulärem Wachstum und Onkogenese führen, wohingegen eine unangemessene Aktivierung die Ursache für neurodegenerative Erkrankungen sein kann (16). Bei Säugetieren konnten zwei Hauptwege zur apoptose-assoziierten Caspasenaktivierung identifiziert werden, der extrinsische oder todesrezeptorvermittelte Weg und der intrinsische, mitochondriale Weg (Abbildung 1; (17, 18). Caspasen übernehmen eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade, da beide Aktivierungswege in deren Aktivierung münden und diese essenziell für das Ablaufen der weiteren Apoptose sind. Innerhalb der oben erwähnten Aktivierungswege werden zwei Phasen beschrieben, die Initiator- und Effektorphase (19).

1.1. Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische oder todesrezeptorvermittelte Weg wird initiiert, indem Liganden (beispielsweise von Lymphozyten ausgeschüttete Zytokine) an die cysteinreiche Außendomäne eines „Todesrezeptors“ binden. Dieser Rezeptor gehört der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie an (20). Mitglieder dieser Rezeptorfamilie weisen eine zytoplasmatische Domäne von über 80 Aminosäuren auf, die als Todesdomäne (*death domain*) bezeichnet wird. Die am besten beschriebenen Todesrezeptoren sind zum einen Fas (wird auch als *cluster of differentiation* (CD95) oder *apoptosis antigen 1* (APO-1) bezeichnet), ein Typ-1 Membranprotein und Rezeptor für den Fas-Liganden (FasL) (21, 22). Weitere Todesrezeptoren sind *TNF receptor 1* (TNFR1), *Death receptor 4* (DR4) bzw. *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-2), CD40, CD27 und CD30 (23, 24, 25). Nach der Bindung der entsprechenden Liganden werden zytoplasmatische Adapterproteine durch deren korrespondierende Todesdomänen rekrutiert (26, 27, 28). Bedeutende Adapterproteine stellen zum einen das *Fas-associated death domain protein* (FADD) und das *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) dar. Ersteres wird durch die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor rekrutiert (27, 28) und bindet an Fas über Wechselwirkungen zwischen den Todesdomänen (29, 30). Letzteres wird durch die Bindung des TNF-Liganden an den TNF-Rezeptor rekrutiert. Der als „todinduzierende Signalkomplex“/*Death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnete Komplex besteht aus dem Todesrezeptor Fas, FADD und der pro-Caspase-8 (24, 31, 32). Die Fas/FADD-DISC Rezeptorplattform wird charakterisiert durch ein oligomeres Netzwerk, vermittelt über Proteininteraktionen der Todesdomänen von Fas und FADD (33, 34). Nachfolgend oligomerisiert die pro-Caspase-8 und wird autokatalytisch aktiviert (35, 36). Eine Verbindung zum mitochondrialen Apoptoseweg besteht über den *BH3-interacting death domain agonist* (Bid), ein BH3-only-Protein, das als Substrat von der aktiven Caspase-8 gespalten wird (37, 38). Das C-terminale Fragment, das als verkürztes/*truncated* Bid (tBid) bezeichnet wird, (39) transloziert dann an die Mitochondrien und kann den intrinsischen Signalweg aktivieren. Ebenso kann die Initiatorcaspase-8 oder -10 nachfolgend die Effektorcaspasen-3 und -7 aktivieren und somit im extrinsischen Signalweg die Apoptose auslösen (40).

1.2. Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische oder auch mitochondrienabhängige Weg der Apoptose kann durch zahlreiche Stimuli aktiviert werden. Hierzu zählen unter anderem durch UV-Strahlung, virale Infektionen oder chemotherapeutische Medikamente ausgelöste DNA-Schäden. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die Mitglieder der *B-cell-lymphoma* (Bcl)-2-Familie. Die Bcl-2-Familie reguliert bei Wirbeltieren den mitochondrialen Weg der Apoptose durch Wechselwirkungen, die die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) beeinflussen (41). Es werden pro- und anti-apoptische Bcl-2-Familienmitglieder unterschieden. Die beiden pro-apoptischen Bcl-2-Effektorproteine *Bcl-2 associated X protein* (Bax) und *Bcl-2 antagonist/killer 1* (Bak) können durch BH3-Proteine (ebenfalls pro-apoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie) wie tBid (42) aktiviert werden. Dabei erfahren die beiden pro-apoptischen Proteine eine Konformationsänderung mit der Bildung eines homo-oligomeren Komplexes, der zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt (43). Nachfolgend MOMP kommt es zum Ausstrom von Cytochrom *c* (39, 44, 45) und dem *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI* (Smac/DIABLO) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (46, 47). Damit nachfolgend die Initiatorcaspase-9 aktiviert werden kann, muss Cytochrom *c* an den *apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1) binden und unter Hydrolyse von dATP/ATP einen oligomeren Komplex bilden (48, 49). Der oligomere Apaf-1/Cytochrom *c* und dATP-Komplex wird als Apoptosom bezeichnet (50). Der Aufbau des Apoptosoms führt zur Rekrutierung der pro-Caspase-9 und zum anschließenden Aufbau eines aktiven Holoenzym und zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-9 (51, 52).

Smac ist ein mitochondriales, kernkodiertes Protein. Beim Import in die Mitochondrien wird Smac proteolytisch gespalten, und diese Spaltung ist als Reifung für seine Funktion notwendig. Die Reifung/Spaltung erfolgt durch die mitochondriale *presenilin-associated-rhomboid-like* Protease (PARL) (53). Mit dem neu generierten N-Terminus bindet Smac an die zytosolischen *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) wie *cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2* (cIAP1/2) und *X chromosome-linked IAP* (XIAP). Bei der Interaktion mit XIAP agiert Smac als Homodimer, wobei der Kontakt über ein N-terminales Motiv, bestehend aus 4 Aminosäuren (Ala-Val-Pro-Ile), vermittelt wird (54, 55). Smac kann die Apoptose

fördern, indem es den inhibitorischen Effekt von XIAP auf die Caspase-9 und -3 neutralisiert (46, 54, 56). Weiter ist anzumerken, dass Smac je nach Zelle unterschiedlich wichtig ist.

Nachdem Caspase-9 aktiviert wurde können nachfolgend die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert werden. Diese können anschließend zahlreiche Proteine spalten und zur Apoptose führen (57, 58). Effektorcaspasen induzieren die Spaltung chromosomaler DNA durch die Aktivierung der spezifischen *caspase-activated DNase* (CAD) (59, 60). Dafür spaltet die Caspase-3 den *inhibitor of caspase-activated DNase* (ICAD) an zwei Positionen, was zur Aktivierung der DNase CAD führt (61). Am Ende der Kaskade führt dieser Prozess zur Fragmentierung der Zelle in kompakte membranumschlossene Strukturen („apoptotische Körper“), die beispielsweise durch Makrophagen phagozytiert werden (13, 62).

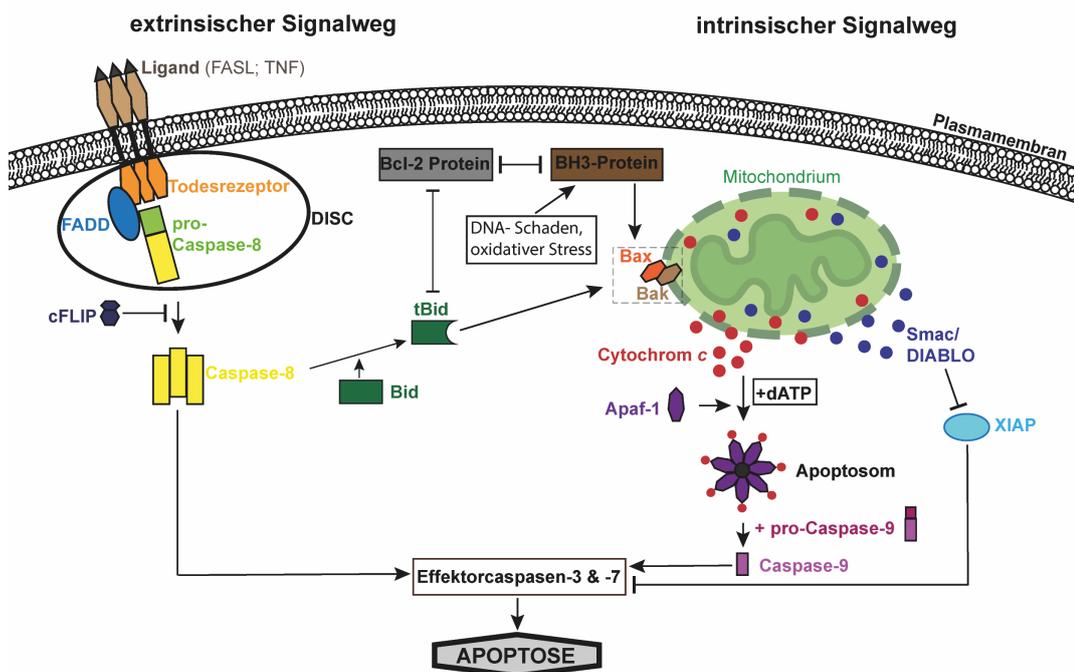


Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose

Nach der Bindung des Liganden an den TNF-Rezeptor wird das Adapterprotein FADD an die Todesdomäne des Rezeptors für die Bildung eines DISC rekrutiert. Dieser Komplex ermöglicht die Aktivierung der Caspase-8 im extrinsischen Signalweg. Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs erfolgt durch DNA-Schäden, die zur Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax und Bak und nachfolgender Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit dem Resultat des Austritts der Intermembranraumproteine Cytochrom *c* und Smac, führt. Cytochrom *c* führt zusammen mit Apaf-1, dATP und anschließender Bindung der pro-Caspase-9 zur Bildung des Apoptosoms, welches die Aktivierung der pro-Caspase-9 ermöglicht. Smac hebt durch Inhibition von XIAP die Blockade der Effektorcaspasen-3 und -7 auf. Caspase-10 und -8 aktivieren ebenfalls die Effektorcaspasen mit nachfolgender CAD-Aktivierung. Die Proteine der Bcl-2-Familie

sind an den Mitochondrien lokalisiert und hier nur zur einfacheren Darstellung anscheinend zytosolisch.

1.3. Pro- und anti-apoptische Proteine

Mitglieder der Bcl-2-Familie haben eine oder mehrere Bcl-2-Homologie-Regionen gemeinsam, die durch Sequenz, Struktur und Funktion definiert sind (42, 63). Die anti-apoptischen Proteine (Bcl-2, *B-cell lymphoma gene x (long form)* (Bcl-X_L), Bcl-w, *myeloid-cell leukemia sequence 1* (Mcl-1) und *Bcl-2 like protein A1* (A1)) besitzen vier konservierte Bcl-2-Homologiedomänen (BH), die als BH1 bis BH4 bezeichnet werden (63). Diese können der Entstehung von MOMP entgegenwirken, indem sie sowohl an Bax und Bak als auch an die BH3-only-Proteine binden und diese durch Interaktion mit deren BH3-Domänen hemmen (64, 65). Die pro-apoptischen Proteine lassen sich wiederum in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen die „Multi-Domain“-Proteine mit BH1-3-Domänen (Bax, Bak und Bok) und die BH3-only-Proteine (*Bcl-2-interacting mediator of cell death* (Bim), Bid, *Bcl-2-antagonist of cell death* (Bad), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma), Noxa, *Bcl-2 modifying factor* (Bmf), Bik und Harakiri (Hrk)) (66, 67, 68). Bei den BH3-only-Proteinen ist des Weiteren zu unterscheiden, ob sie als „direkte Aktivatoren“ agieren, indem sie Bax und Bak direkt binden und aktivieren (z.B. Bim, tBid, evtl Puma), oder als „Sensibilisatoren“, indem sie an anti-apoptische Proteine binden und diese neutralisieren (z.B. Noxa, Bad) (69, 70). Auch letzteres führt schließlich zur Bax und Bak Aktivierung.

2. Subletale Apoptose (*Minority MOMP*)

Wie bereits unter II 1.2 beschrieben, permeabilisieren die pro-apoptischen Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak die äußere Mitochondrienmembran. Da MOMP zu einem raschen Zelltod führt (71), wurde es oft als der Punkt angesehen, an dem es im Apoptose-Programm zu keiner Rückkehr mehr kommt („*point of no return*“) (4, 5). Ende der 90er Jahre wurde erstmals beobachtet, dass postmitotische Neuronen, denen der „*Nerve-growth-factor*“ (NGF) entzogen wurde, nach der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran lebensfähig waren. Die Voraussetzung hierfür war die ständige Caspaseninhibition und die Ergänzung

eines Wachstumsfaktors (72, 73). 2015 wurde das Auftreten einer subletalen, reduzierten/limitierten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (sogenanntes „*Minority MOMP*“) beschrieben. Dieses „*Minority MOMP*“ wurde durch eine Caspasenaktivierung auf niedrigem Niveau, abhängig von der Integrität des mitochondrialen Apoptoseapparats in Abwesenheit von Apoptose definiert (3, 8). Nach der Behandlung der Zellen mit ABT-737 (Bcl-2-Protein-Antagonist) in einer geringen Dosis, permeabilisierte die äußere Mitochondrienmembran nur bei einem kleinen Teil der Mitochondrien (3). Die Zellen überlebten nach der Behandlung, aber es konnte sowohl eine begrenzte Spaltung mancher Caspasensubstrate als auch das Auftreten CAD-abhängiger DNA-Schäden beobachtet werden, die zu genomischer Instabilität und zu persistierenden Mutationen führten (3). Virus-, Bakterien- und Parasiteninfektionen konnten in den infizierten Zellen ebenfalls eine subletale Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseapparats, sowie die damit verbundene Sekretion von Zytokinen aus Epithelzellen auslösen (8). Es ist derzeit unklar, ob das Bild der kompletten Permeabilisierung weniger Mitochondrien tatsächlich korrekt ist, oder ob nicht auch eine teilweise Freisetzung von Proteinen aus einem größeren Teil des mitochondrialen Netzwerks bei diesen subletalen mitochondrialen Signalen eine Rolle spielt.

3. Inhibitoren von Komponenten der Zelltodsignalwege

3.1. BH3-Mimetika

Substanzen, die als BH3-Mimetika bezeichnet werden, beispielsweise ABT-737, agieren zumindest teilweise wie BH3-only-Proteine und können die Bax/Bak-Aktivierung und somit den mitochondrialen Apoptosesignalweg durch Antagonisierung anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder beeinflussen (74, 75) (Abbildung 2). ABT-737, ein niedermolekularer Inhibitor, bindet an die hydrophobe Furche der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w (74, 76, 77) und nicht an Mcl-1 (78). Unter dem Namen ABT-263 (Navitoclax) wird ein oral verfügbares Homolog von ABT-737 als Chemotherapeutikum bei verschiedenen Tumorentitäten eingesetzt. Allerdings wurde es mit dem Auftreten von Thrombopenien in Zusammenhang gebracht (79).

Diese Nebenwirkung ist die Folge der Inhibition von Bcl-X_L; sie tritt bei einem spezifischen Bcl-2-Inhibitor (ABT-199) nicht auf.

S63845 ist ein Molekül, das spezifisch an die BH3-Bindungsfurche von Mcl-1 bindet (80). Die Apoptoseinduktion folgt denselben Prinzipien wie bei den Inhibitoren von Bcl-2, wobei unterschiedliche Zelltypen unterschiedlich empfindlich sind (81).

3.2. pan-Caspasen-Inhibitoren

pan-Caspasen-Inhibitoren können alle Caspasen inhibieren und somit die Apoptose verhindern (82, 83). Ursprünglich wurde Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (Z-VAD-FMK) für therapeutische Zwecke entwickelt. Es wurde jedoch eine Zytotoxizität des metabolischen Derivats der FMK-Verbindung beobachtet, weshalb der Inhibitor nur für *in vitro* Experimente verwendet werden kann (84). Der pan-Caspasen-Inhibitor Z-VAD-FMK enthält die Aminosäure Aspartat am C-Terminus, die für Caspasensubstrate obligat ist. Ebenso kann der Benzyloxycarbonylrest unspezifisch an die aktiven Zentren der Caspasen binden (85, 86). An das aktive Zentrum der Caspase bindet kovalent die Fluoromethylgruppe und induziert somit die Blockierung der Caspase (85, 86). Chinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[2,6-difluorphenoxy]-methylketon (Q-VD-OPh) ist ebenfalls ein pan-Caspasen-Inhibitor. Im Vergleich zu Z-VAD-FMK blockiert dieser die Apoptose aber bereits in geringeren Konzentrationen. Außerdem konnte eine deutlich ausgeprägtere Hemmung der Caspasen-3, -8 und -9 beobachtet werden (82, 83).

3.3. Inhibitor der Nekroptose

Die Nekroptose, ein zellulärer Mechanismus des nicht-apoptotischen regulierten Zelltods, wird in manchen Zellen durch Aktivierung von Todesrezeptoren, beispielsweise des TNF-Rezeptors (siehe II 1.1) induziert, wenn die Einleitung der caspasenabhängigen Apoptose blockiert wird (87). Eine entscheidende Rolle spielt die *receptor interacting protein kinase 1* (RIPK1). Diese Kinase kann nach der Autophosphorylierung RIPK3 binden und als RIPK1-RIPK3-Komplex nachfolgend das *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) phosphorylieren, was in der Folge zu lytischem Zelltod und dem Verlust der

Zellmembranintegrität führt (87, 88, 89). Necrostatin kann RIPK1 inhibieren, indem es mit der T-Schleife, einer wesentlichen Struktur für die Rezeptorbindung der Todesdomäne, interagiert und somit die Autophosphorylierung von RIPK1 verhindert (87, 90). Somit ist nach der Behandlung mit Necrostatin die Nekroptose blockiert. Unter nicht experimentellen Verhältnissen blockiert Caspase-8 durch Spaltung von RIPK1 die Nekroptose.

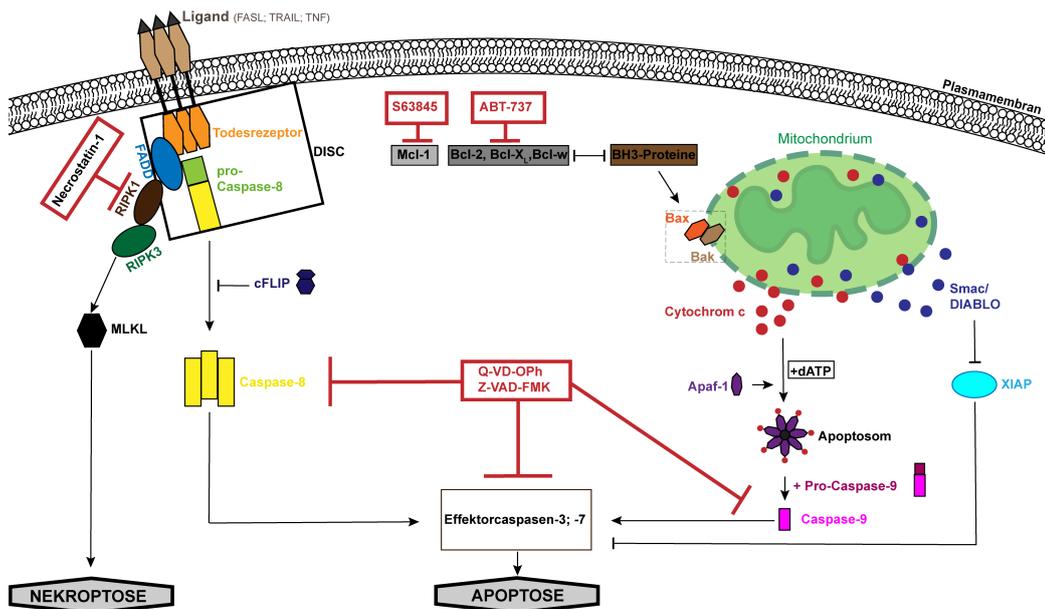


Abbildung 2: Angriffspunkte der Inhibitoren

Necrostatin inhibiert RIPK1 und somit den Signalweg der Nekroptose. Die pan-Caspasen-Inhibitoren Q-VD-OPh und Z-VAD-FMK führen zur Blockade aller Caspasen und somit der Apoptose. S63845 inhibiert das pro-apoptotische Protein Mcl-1, wohingegen ABT-737 Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w inhibiert. Die Proteine der Bcl-2-Familie sind an den Mitochondrien lokalisiert und hier nur zur einfacheren Darstellung anscheinend zytosolisch.

4. DNA-Schaden und γ H2AX als Marker

Diverse Stimuli, beispielsweise UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung (91), Chemotherapeutika oder CAD-Aktivierung können Doppelstrangbrüche der DNA verursachen. Die Unfähigkeit Brüche zu reparieren, führt zu genomischer Instabilität und möglichen Folge wie Karzinogenese und Zelltod. Damit diese DNA-Schäden behoben werden können, besitzen die Zellen ein effektives DNA-Reparatursystem (92). Bedeutende Proteinkinasen, die in Säugetierzellen die DNA-Schadensantwort kontrollieren, sind zum einen *ataxia teleangiectasia mutated*

kinase (ATM), *ATM- and Rad3-related* (ATR) und die *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK), die von DNA-Strangbrüchen rekrutiert und aktiviert werden (93, 94). Zwei der am besten untersuchten ATM/ATR-Substrate sind die *checkpoint kinase 1* (Chk1) und Chk2, die von den proximalen Kinasen phosphoryliert werden und nachfolgend als Kontrollkinasen den Zellzyklus kontrollieren beziehungsweise hemmen können (93, 95). ATR aktiviert via Chk1 den G₂/M Kontrollpunkt (96, 97), wohingegen ATM via Chk2 den G₁/S Kontrollpunkt aktiviert (98). Diese Aktivierung der Kontrollpunkte verlängert die Zeit für die DNA-Reparaturen, bevor eine erneute Replikation oder Mitose erfolgt (99). γ Histon (H) 2AX kann als Marker für DNA-Schäden verwendet werden (100), denn nach der Bildung von Doppelstrangbrüchen erfolgt eine ATM/ATR/DNA-PK-vermittelte Phosphorylierung von Serin-139 im C-terminalen Ende der Histon-H2A.X-Variante (101, 102). H2A.X, eine von drei konservierten Histon-H2A-Proteinarten, unterscheidet sich durch das Vorhandensein eines konservierten Motivs am COOH-Terminus von den anderen (103). Zur Nukleosomenkomplexbildung tragen die Histone der H2A-Familie bei; sie sind über die gesamte chromosomale DNA verteilt.

5. NF- κ B-Signalweg

Die Familie der Kernfaktor- κ B (NF- κ B)-Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Entwicklung und dem Überleben von Lymphozyten (104), der Aktivierung von Immunantworten durch Zytokinfreisetzung, (105) oder Zellwachstum und -entwicklung (106). Defekte in der Signalübertragung oder fehlerhafte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs können zu Autoimmun- und Entzündungsreaktionen führen (107). NF- κ B spielt auch eine Rolle bei der Krebsentstehung und -progression. Ebenso wird ihm eine regulatorische Rolle bei Tumoren zuteil (108). NF- κ B-Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die sequenzspezifisch DNA binden (106) und die Transkription von Zielgenen initiieren (109). Die NF- κ B-Familie besteht bei Säugetieren aus fünf verwandten Transkriptionsfaktoren: p50, p52, p65 (auch *Rel-associated protein A* (RelA) genannt), RelB und c-Rel, die alle eine N-terminale DNA-Bindungs/-Dimerisierungsdomäne (Rel-Homologiedomäne) aufweisen (110,

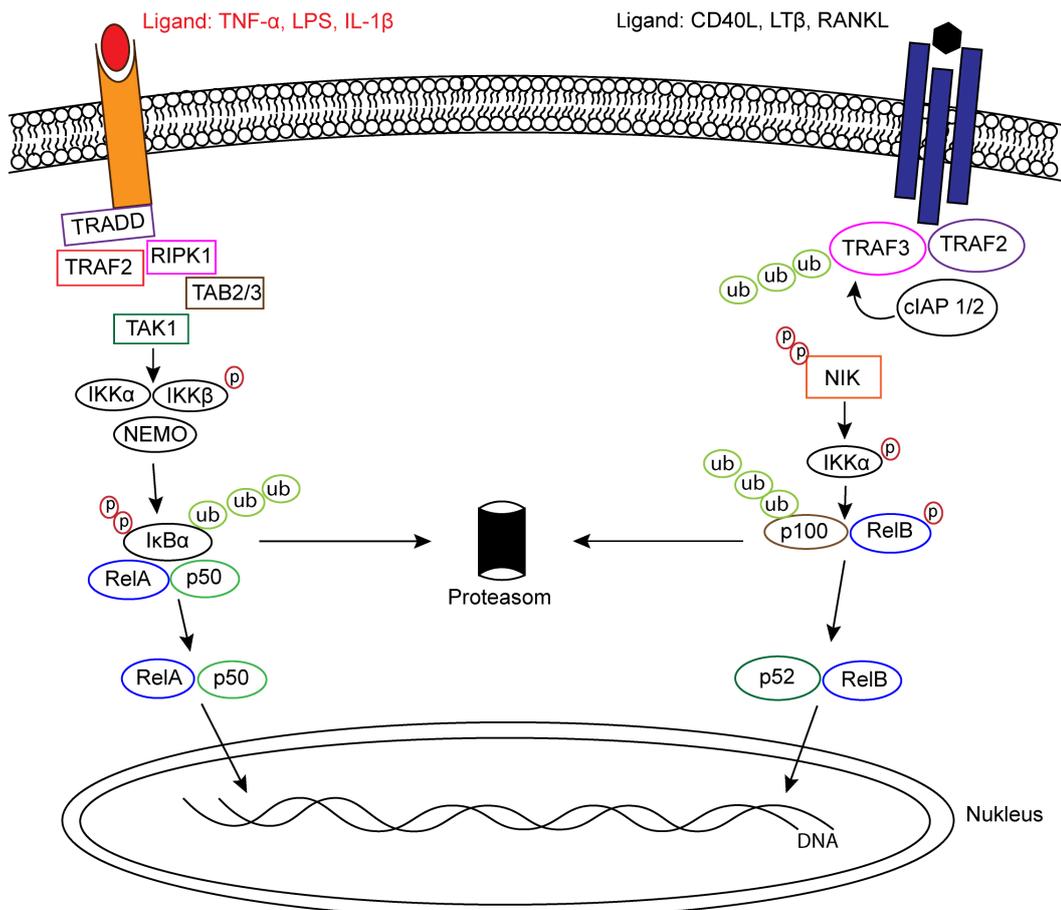
111, 112). Lediglich die drei Mitglieder p65, c-Rel und RelB weisen zusätzlich eine *transcriptional activating domain* (TAD) auf, die es ihnen ermöglicht, im Zellkern die Zielgenexpression zu induzieren (113). p50 und p52 weisen keine Transkriptionsdomäne auf und können daher die Transkription der Zielgene nur durch Heteromerisierung mit p65, c-Rel oder RelB ermöglichen. Im nicht-stimulierten Zustand sind die NF- κ B-Transkriptionsproteine im Zytoplasma an I κ B (Familie inhibitorischer Proteine) gebunden und können somit nicht in den Nukleus translozieren (114, 115). Bei dem NF- κ B-Signalweg wird zwischen dem klassischen und alternativen Weg unterschieden (Abbildung 3).

5.1. Klassischer/kanonischer NF- κ B-Signalweg

Eine Schlüsselrolle beim klassischen Signalweg nimmt der „IKK-Komplex“ (I κ B Kinase) ein. Die Bindung eines Liganden (Zytokine wie TNF oder IL-1) an ihren Zelloberflächenrezeptor (z.B. TNF-Rezeptor oder „*Toll-like*-Rezeptor/IL-1-Rezeptor“) führt zu der Rekrutierung von TRADD an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors, sowie des Proteins *TNF receptor associated factor-2* (TRAF2) (116). TRAF2 rekrutiert RIPK1, dass an dem Komplex ubiquitiniert wird und anschließend mit der *transforming growth factor β -activated kinase 1* (TAK1), einem Mitglied der Mitogen-aktivierenden Proteinkinase-Familie (MAPK), über die TAK-bindenden Proteine (TAB) TAB1, TAB2 und TAB3 interagieren kann (117, 118, 119). Dies führt zur Oligomerisierung und Aktivierung von TAK1 (120). Aktiviertes TAK1 phosphoryliert nachfolgend IKK β und aktiviert den IKK-Komplex (121, 122). Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytisch aktiven Kinasen IKK β und IKK α und der regulatorischen Untereinheit IKK γ oder *NF- κ B Essential Modulator* (NEMO) (123, 124). Nach der Aktivierung kann zum einen p105 an den Serinresten-927 und -932 phosphoryliert werden, was zum proteosomalen Abbau und zum Spaltprodukt p50 führt (125). Zum anderen wird der Inhibitor I κ B α phosphoryliert und proteosomal degradiert, wodurch das nun freie NF- κ B in den Zellkern translozieren kann (126). p50 bildet mit p65 ein Heterodimer, bevor es in den Zellkern transloziert und spezifisch an die Promoterregion der Zielgene bindet (105, 115).

5.2. Alternativer/nicht kanonischer NF- κ B-Signalweg

Eine zentrale Signalkomponente des alternativen Signalwegs stellt die *NF- κ B-inducing-kinase* (NIK) dar. Wenn kein Ligand an diverse Rezeptoren der TNF-Familie wie beispielsweise *B-cell activating factor receptor* (BAFFR) (127), CD40 (128) oder Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β R) (129) bindet, wird NIK kontinuierlich abgebaut (130). Dieser Abbau erfolgt, indem die N-terminale Domäne von NIK mit TRAF3 interagiert und über eine TRAF3-Dimerisation mit TRAF2 an cIAP1/2 rekrutiert wird. Dies führt zur Ubiquitinierung und anschließenden proteosomalen Degradation von NIK (131, 132). Die Aktivierung von NIK erfolgt nach Bindung eines spezifischen Liganden an seinen Rezeptor, da somit TRAF2 und 3 zum Rezeptorkomplex rekrutiert werden. Daraus folgt, dass cIAP1/2 mittels der TRAF2 vermittelten Bindung an TRAF3 nicht mehr NIK, sondern TRAF3 ubiquitiniert und abbaut (133). Stabilisiertes NIK aktiviert nachfolgend IKK α durch Phosphorylierung an dem Serinrest-176 (134, 135). Anschließend phosphoryliert IKK α p100 (136). Diesem wird daraufhin proteosomal die C-terminale inhibitorische Domäne entfernt, wodurch das Produkt p52 erzeugt wird. Das Spaltprodukt p52 transloziert zusammen mit RelB in den Zellkern (134, 137).

klassischer NF- κ B-Signalweg**alternativer NF- κ B-Signalweg**Abbildung 3: Klassischer und alternativer NF- κ B-Signalweg

Beim klassischen NF- κ B-Signalweg bindet ein Ligand an den zellständigen Rezeptor, was nachfolgend zur Rekrutierung von TRADD, TRAF2 und RIPK1 führt. Dieser Komplex ermöglicht die Aktivierung von TAK1, das anschließend IKK β phosphoryliert und somit den IKK-Komplex aktiviert. p50 und RELA translozieren zusammen in den Nukleus. Nach der Bindung des Liganden an einen Rezeptor führt dies beim alternativen Signalweg zur Ubiquitinierung von TRAF3. NIK aktiviert daraufhin IKK α , das nachfolgend p100 phosphoryliert, wodurch anschließend p52 zusammen mit RelB in den Nukleus transloziert.

6. MAP-Kinasen

Ende der 80er Jahre wurde eine neue Serin/Threonin-Kinase entdeckt, die MAP-Kinase/n oder auch MAPK (138). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Genexpression, Apoptose, Zellproliferation, Migration und greifen in viele andere Signalwege ein, wie beispielsweise in den NF- κ B-Signalweg (139). Innerhalb der MAP-Kinasen-Familie lassen sich drei Gruppen unterscheiden.

Zum einen die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2) (140), c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 (141) (Abbildung 4). Gemeinsam diesen drei Gruppen ist ein dreistufiges Prinzip der Aktivierung. Diese Kaskade besteht aus einer MAPK, einer MAPK-Kinase (MAP2K) und einer MAP2K-Kinase (MAP3K) (142). Diese Proteinkinasen werden an Threonin- (Thr) und Serinresten phosphoryliert, was zur Aktivierung führt (143). Die MAP-Kinasen sind wichtige signalübertragende Enzyme (144), die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden und schließlich im Nukleus die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren oder Zytoskelettproteinen hervorrufen (145). Nur aktivierte MAP-Kinasen können in den Nukleus translozieren, wohingegen die nicht-aktiven Formen der Kinasen im Zytoplasma verbleiben.

6.1. ERK1/2-Aktivierungskaskade

Die Aktivierungskaskade von ERK wurde als Erstes entdeckt und beschrieben. Dessen Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an eine Rezeptortyrosinkinase an der Plasmamembran (146). Nachfolgend wird das Proto-Onkogen *Rat sarcoma* (Ras) aktiviert, dass daraufhin die Serin/Threonin-Proteinkinase *rapidly growing fibrosarcoma* (Raf), eine MAP3-Kinase (147, 148) durch Phosphorylierung aktiviert. Die phosphorylierte MAP3-Kinase aktiviert nachfolgend die MAP2-Kinase MEK 1/2 (146, 149). Als letzte Stufe der Kaskade wird ERK1/2 als MAPK aktiviert. Die ERK-Kinase phosphoryliert im Zellkern eine Gruppe von Substratproteine, wie die *ribosomal S6 kinase* (RSK) oder Transkriptionsfaktoren (150).

6.2. p-38-Aktivierungskaskade

Eine weitere Kaskade führt zu der Aktivierung der MAP-Kinase p38. Diverse extrazelluläre Stimuli wie UV-Licht, Hitze oder entzündungsfördernde Zytokine (z.B. TNF- α oder IL-1) aktivieren diesen Signalweg (151, 152). Oben genannte Stimuli führen zur Aktivierung der MAP3-Kinasen *apoptosis signal-regulated kinase 1* (ASK1), TAK1 oder der Mitogen aktivierenden Proteinkinasen-Kinasen (MEKK 1-4). Die nachfolgend an ihren Serin/Threoninresten phosphorylierten MAP2-Kinasen sind MKK3 und MKK6 (152, 153). Anschließend wird p38 durch die gleichzeitige Phosphorylierung von Thr-180 und Tyr-182 aktiviert (152).

Wichtige von p-p38 aktivierte Transkriptionsfaktoren stellen zum einen *activating transcription factor 1* (ATF1), *ETS transcription factor ELK1* (Elk-1) oder *HMG box-containing protein 1* (HBP1) dar (154, 155).

6.3. SAPK/JNK-Aktivierungskaskade

Als letzte Kinase in der Gruppe ist JNK zu beschreiben. Bezüglich der Aktivierung sind einige Überschneidungen der extrazellulären Stimuli zu der Aktivierungskaskade von p38 erkennbar. Neben Umweltstress spielen entzündungsfördernde Zytokine als Stimuli eine wichtige Rolle (156, 157, 158). Nach der Bindung von Zytokinen an einem Rezeptor wird MEKK 1-4 oder ASK1 oder MLK oder TAK1 aktiviert und kann die nachgeschaltete MAP2-Kinase MKK4 und 7 aktivieren (142). Die MAP2-Kinase phosphoryliert JNK an Thr-183 und -185. Als wichtigstes Substrat von JNK fungiert c-Jun ebenso ATF2, Elk-1 und p53 (159, 160). Im Gegensatz zu p38 wurden zwei JNK-Kinasen gefunden, und zwar JNK1 und 2 mit einer Größe von 46 und 55 kDa, wobei letztere eine höhere Affinität zu c-Jun aufweist (161). Ein weiteres wichtiges Ziel von JNK stellt der Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1) dar, bestehend aus Jun und FOS (162).

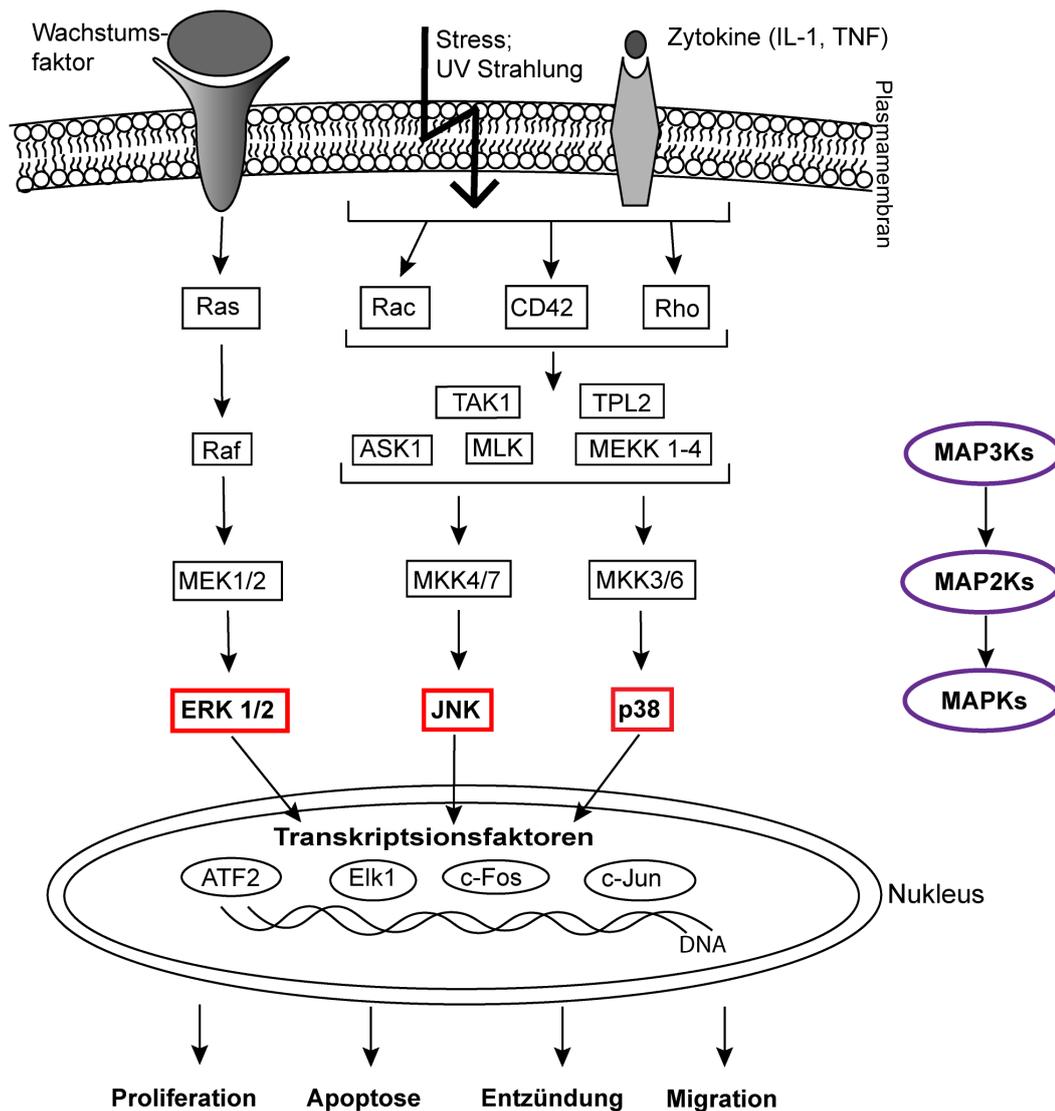


Abbildung 4: Signalwege der MAP-Kinasen

Nach Bindung des Wachstumsfaktors an einen Zellmembranrezeptor erfolgt die Ras- und nachfolgend die Raf-Aktivierung. Die Aktivierung der nachfolgenden verschiedenen MAP-Kinasen (MAP3K und MAP2K) führt schließlich zur Phosphorylierung von ERK1/2. Die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 erfolgt analog dazu zum einen mittels Zytokinbindung an einen Rezeptor, zum anderen durch Umweltstress. Nachfolgend werden diverse MAP3Ks phosphoryliert, was schließlich zur Phosphorylierung von MKK4/7 oder MKK3/6, der MAP2Kinase führt.

6.4. Verbindung zwischen MAP-Kinasen und Apoptose

Wie unter II 6. beschrieben, regulieren die MAP-Kinasen eine Vielzahl biologischer Prozesse. Abhängig von den Stimuli und/oder dem Zelltyp kann beispielsweise nach der JNK-Aktivierung die Zellproliferation oder Apoptose erfolgen. Die MAP-Kinasen haben Einfluss auf die Spiegel von sowohl pro- als

auch anti-apoptotischen Proteinen. JNK und p-p38 regulieren den Transkriptionsfaktor p53. Die von den MAP-Kinasen vermittelte Phosphorylierung stabilisiert p53 und kann die Apoptose initiieren (163). Ebenso ermöglicht die Phosphorylierung von p53 eine Komplexbildung mit p73, was nachfolgend die Expression der pro-apoptotischen Proteine Puma und NOXA induziert (164). In primären Neuronen konnte gezeigt werden, dass JNK die Phosphorylierung des Serinrestes von Bad induziert und dessen apoptotische Wirkung fördert (165). Sowohl die durch JNK als auch p38 (166) vermittelte Bim Phosphorylierung verstärkt die Bax-abhängige Apoptose (167). Die ERK1/2-Aktivierung ist oftmals mit anti-apoptotischen Effekten assoziiert (168). ERK1/2 kann Bim_{EL} direkt phosphorylieren, was den proteosomalen Abbau von Bim fördert und die Bindung von Bim_{EL} an Proteine der Bcl-2-Familie hemmen kann.

7. Immunsystem

Unser Organismus ist ständig Pathogenen ausgesetzt, die vom Körper erkannt und beseitigt werden müssen. Bereits im Jahr 430 v. Chr. beschrieb der griechische Historiker Thukydides, wie Menschen sich von einer bakteriellen Erkrankung erholten und kein weiteres Mal erkrankten (169). Genau diese Beobachtung ist auf unser Immunsystem zurückzuführen. Es wird das angeborene und erworbene Immunsystem mit unterschiedlichen Zelltypen unterschieden. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen, *Innate lymphoid cells* (ILC) und Granulozyten. Mikroorganismen werden von diesen Zellen durch keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren erkannt, wie beispielsweise die *toll-like*-Rezeptoren (170). Durch diese Erkennung und Rezeptorbindung können weitere Signalwege, wie der NF- κ B-Signalweg, durch das Adapterprotein *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) aktiviert werden (171). Die angeborene Immunantwort ist nicht gezielt gegen bestimmte Pathogene gerichtet, aber diese Immunzellen treffen nach Kontakt eines Pathogens als erste am Infektionsort ein und bilden so die erste Verteidigungslinie. Die erworbene oder spezifische Immunreaktion auf der anderen Seite ist, wie der Name vermuten lässt, spezifisch gegen einzelne Mikroorganismen gerichtet, indem spezifische Antikörper sezerniert und Antigen-Rezeptoren exprimiert werden. T-

und B-Lymphozyten, die Zellen der erworbenen Immunität, benötigen für ihre Stimulation die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen. Nach einer Infektion entsteht ein immunologisches Gedächtnis, das bei einer Re-Infektion zur klonalen Expansion dieser antigenspezifischen T- und B-Gedächtniszellen und zu einer schnellen Bekämpfung des Erregers führt.

7.1. Chemokine und Zytokine

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind kleine Proteine, die die Wanderung von Immunzellen steuern und somit eine wesentliche Funktion u.a. innerhalb des Immunsystems einnehmen (172, 173). Es kann zwischen entzündlichen und homöostatischen Chemokinen unterschieden werden (174). Ende der 80er Jahre wurden die ersten Chemokine (CXCL-8 und CCL-2) beschrieben (175). Auf Grundlage der Anordnung der beiden N-terminalen Cysteinreste wurden 4 Gruppen mit den zwei großen Untergruppen CXC und CC innerhalb der Chemokin-Gen-Superfamilie definiert. Der Unterschied zwischen diesen Gruppen besteht darin, dass eine Aminosäure (X) zwischen den Cysteinresten vorkommt oder nicht. (176, 177) Diese Proteine binden an eine Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse A (178, 179). Die daraus entwickelte Chemokin-Rezeptor-Nomenklatur lautet CC, CXC, XC oder CX3C gefolgt von R (Rezeptor) und einer Zahl. Zytokine sind Proteine mit einem niederen Molekulargewicht (6-70 kDa), die von diversen Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, *Natural killer cells* (NK), Epithelzellen oder Stromazellen sezerniert werden (180). Sie können Immun- und Entzündungsreaktionen steuern und daher als Marker diverser Krankheiten dienen (181). Die Hauptfunktion der Chemokine CXCL-1–8 (menschliches CXCL-8 wird i. allg. als IL-8 bezeichnet) liegt in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu Entzündungsgebieten (182). Die biologische Wirkung der Chemokine wird erst nach der Bindung an deren korrespondierenden Rezeptor erreicht. Bei IL-8 ist es eine Bindung an CXCR1/2 (183). IL-8 wird sowohl von Immunzellen als auch von mesenchymalen Zellen sezerniert (184). Wie viele andere Chemokine dient IL-8 als Chemoattraktor für Immunzellen, fördert aber auch die Zellproliferation (185), die Invasion und den epithelial-mesenchymalen Übergang (186). Außerdem übernimmt es Funktionen in der Angiogenese und kann so zur Tumorgenese beitragen (186, 187, 188). IL-6 wird von T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und vielen weiteren Zellen sezerniert und vermittelt sowohl die

Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen als auch die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen (189). CCL-1, CCL-16, CCL-18 und CCL-23 steuern die Rekrutierung von Monozyten, Eosinophilen und T-Zellen (172).

T-Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, z. B. Zytokine Typ I (z.B. IL-2, IL-12, Interferon (IFN)- γ und TNF- β) und Typ II Zytokine (z.B. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13) (190). Weitere Kategorien sind Tumornekrosefaktoren, Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren und transformierende Wachstumsfaktoren. In Bezug auf ihre Funktion können Zytokine auch in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilt werden (191).

7.2. Zellen der angeborenen Immunabwehr

7.2.1. Myeloide Zellen

Myeloide Zellen gehören zur angeborenen Immunabwehr und beinhalten unter anderem die Granulozyten. Diese lassen sich in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, charakterisiert durch deren jeweilige Granula, unterscheiden. Eosinophile und in geringem Umfang auch die Basophilen sind an der Entstehung zahlreicher Entzündungsprozesse beteiligt, in erster Linie parasitärer Helmintheninfektionen, Gewebeverletzungen oder allergischen Erkrankungen (192, 193). Alle drei Granulozyten-Subtypen entstehen im Knochenmark und differenzieren sich aus der gleichen myeloischen Vorläuferzelle, die sich wiederum aus der multipotenten Vorläuferzelle und aus der hämatopoetischen Stammzelle differenziert. In dieser Arbeit wird der Fokus lediglich auf die neutrophilen Granulozyten und Monozyten gelegt.

7.2.2. Neutrophile Granulozyten

Nach Vollendung der Reifung im Knochenmark regulieren neutrophile Granulozyten (Neutrophile) den CXC-Motif-Chemokinrezeptor (CXCR)4 herunter, wohingegen sie im Falle einer Entzündung und der damit verbundenen Freisetzung aus dem Knochenmark und Infiltration ins Gewebe verstärkt CXCR2 hochregulieren. CXCR2 wirkt als zweite Chemokin-Achse antagonistisch auf CXCR4 (194). Neutrophile wandern als erste Leukozyten in Infektions- und Entzündungsgebiete ein (195). Damit Neutrophile aus den Blutgefäßen in das Gewebe migrieren können, sind Chemokine zur Rekrutierung notwendig (196,

197). Residente Makrophagen oder Monozyten, die zuvor eingedrungene Pathogene phagozytiert haben, sezernieren chemotaktische Botenstoffe wie CXCL-1 oder CXCL-2, was zur Aktivierung von Endothelzellen und der Rekrutierung der Neutrophilen führt. Aktivierte Endothelzellen können im späteren Verlauf ebenfalls Chemokine ausschütten, die eine Adhäsion der Neutrophilen am Endothel und die anschließende Migration in das Infektionsgewebe ermöglichen (198, 199). Neutrophile können Pathogene phagozytieren (200). Die Granula der Neutrophilen enthalten diverse antimikrobielle Proteine, die nach der Fusion der Granula mit dem pathogenhaltigen Phagosom zur Zerstörung der Pathogene beitragen (201, 202). Weiterhin schütten Neutrophile Zytokine aus, die weitere Immunzellen rekrutieren können. Ebenso ist es Neutrophilen möglich mit anderen Immunzellen zu interagieren. Beispielsweise können Neutrophile dendritische Zellen aktivieren (203) oder mittels IL-12 die Umwandlung von naiven T-Zellen zu T-Helferzellen vom Typ 1, die IFN- γ freisetzen, fördern (204). Des Weiteren können Neutrophile über Fc-Rezeptoren an das von B-Zellen sezernierte Immunglobulin G (IgG) und IgA auf oppsonierten Pathogenen binden (205).

7.2.3. Monozyten

Ebenso wie die oben beschriebenen neutrophilen Granulozyten differenzieren die Monozyten aus der granulozytären/monozytären Vorläuferzelle über die monozytäre/dendritische Vorläuferzelle. Monozyten zählen zusammen mit dendritischen Zellen und Makrophagen zu den mononukleären Phagozyten (206). Beim Menschen werden die verschiedenen Monozytengruppen anhand der Expression des Monozyten spezifischen CD-14 und Koexpression des CD-16-Antigens unterschieden (207). Die Monozyten der Mäuse werden anhand der *Lymphocyte antigen 6C* (Ly-6C) Expression definiert, wobei im Blut zusätzlich zwischen stark Ly6C^{hi} („classical monocytes“) und schwach Ly6C^{low} („non-classical, patrolling monocytes“) unterschieden wird (206). Ly6C^{hi} Monozyten wandern aus dem Knochenmark und dem Blut in entzündetes Gewebe ein, als Reaktion auf *monocyte-chemoattractant-proteins* (MCPs), die CC-Chemokinrezeptor Typ 2 (CCR2), der auf der Oberfläche der Monozyten exprimiert wird (208) aktivieren (209, 210). Sie können auch Interferon Typ 1 als Reaktion auf eine Virusinfektion produzieren (211). Ins Gewebe eingedrungene Monozyten können sich zu Gewebemakrophagen (212) oder dendritischen Zellen

weiter differenzieren (213). Ly6C^{low} Monozyten verbleiben im Gefäßsystem und patrouillieren die Gefäßwand nach Verletzungen ab. Dieses Patrouillenverhalten ist von der erhöhten Expression von C-X3-C Chemokinrezeptors 1 (CX3CR1) abhängig, ebenso ist der Transkriptionsfaktor *Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1* (NR4A1) für die Entwicklung dieser Subpopulation aus den Knochenmarkvorläufern essenziell (214, 215, 216, 217).

7.2.4. Innate lymphoid cells (ILC)

ILCs gehören wie die myeloiden Zellen dem angeborenen Immunsystem an, allerdings mit dem Unterschied, dass ILCs sich aus der lymphoiden Vorläuferzelle weiter differenzieren (218). Aus der gleichen Vorläuferzelle entwickeln sich auch die T- und B-Lymphozyten, zugehörig zu dem erworbenen Immunsystem. Im Gegensatz zu letzteren beschriebenen Lymphozyten besitzen ILCs keinen T-Zell (TCR)- oder B-Zell-Rezeptor (BCR) (219). Die ILCs lassen sich in 3 verschiedene Gruppen unterteilen und unterscheiden sich untereinander in Bezug auf ihre Zytokinproduktion, Expression von Transkriptionsfaktoren und Effektorfunktion (218). Hauptsächlich sind ILCs auf Schleimhautoberflächen, wie in der Lunge, dem Gastrointestinal- oder dem Urogenitaltrakt und nur mit Ausnahme in lymphatischen Organen vorzufinden (220). Sie spielen im Epithelgewebe eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Pathogene und bei der Gewebereparatur, sowie im Rahmen der Gewebehomöostase (221). Vertreter der ILCs der Gruppe 1 stellen die NKs dar, die in den 70er Jahren erstmals beschrieben wurden und im Gegensatz zu ILCs anderer Gruppen zytotoxisch sind (222). ILC1-Zellen reagieren auf IL-12, exprimieren den Transkriptionsfaktor *T-box transcription factor TBX21* (T-bet) und sezernieren die T-Helferzellen (TH)-1-assoziierten Zytokine IFN γ und TNF (223, 224, 225, 226). ILCs der Gruppe 2 reagieren auf IL-25 und IL-33, benötigen für ihre Entwicklung den Transkriptionsfaktor GATA3 (227) und produzieren die TH2-assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13 (228, 229, 230, 231). ILCs der Gruppe 3 reagieren auf IL-7, benötigen den Transkriptionsfaktor ROR γ t und produzieren die TH17-assoziierten-Zytokine IL-17 und IL-22 (232, 233, 234).

7.2.5. Natürliche Killerzellen

Wie unter II 7.2.4 beschrieben, gehören die NK-Zellen der Gruppe 1 der ILCs an. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, als zytotoxische Immunzellen infizierte Zellen anhand des Verlusts des *Major histocompatibility complex* (MHC-I) zu erkennen, Perforin und Granzyme auszuschütten und deren Apoptose einzuleiten (235, 236). Die Gruppe der NK-Zellen ist heterogen und geprägt von phänotypischen und funktionellen Unterschieden innerhalb der Gruppe (237, 238). Seit längerer Zeit waren die im Blut zirkulierenden *conventional NK cells* (cNK) bekannt, und vor 10 Jahren wurden sogenannte *tissue-resident NK cells* (trNK) in Leber, Niere, Uterus und Haut beschrieben (239, 240, 241). Die Entwicklung der NK-Zellen beginnt im Knochenmark. Es folgen diverse Entwicklungsstadien, die durch den Erwerb und Verlust verschiedener Oberflächenmarker, NK-Zellrezeptoren und Integrine gekennzeichnet sind (242). Allen Untergruppen gemeinsam ist die lymphoide Vorläuferzelle (243). Besonders wichtig für die Vermehrung und Differenzierung hin zur reifen NK-Zelle ist das von den Stromazellen des Knochenmarks exprimierte IL-15 (244, 245, 246). Eine hohe Expression von CD11b und CD43 kennzeichnet die terminale Reifung (242). Reife NK-Zellen sezernieren Zytokine wie IFN- γ , *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und TNF- α , die auch als Schnittstelle zur erworbenen Immunantwort und Interaktion mit T-Lymphozyten dienen (247, 248). Eine Besonderheit stellen die NKT-Zellen dar, die sowohl den T-Zell-Rezeptor als auch verschiedene Rezeptoren der NK-Linie (NK1.1, NKG2D, Ly49) exprimieren (249, 250).

7.3. Zellen der adaptiven Immunabwehr

7.3.1. T- und B-Lymphozyten

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten differenzieren sich aus der lymphoiden Vorläuferzelle. In dieser Arbeit werden ausschließlich die T-Lymphozyten behandelt. Aus dem Knochenmark wandern die Vorläufer der T-Lymphozyten in den Thymus ein, denn dort findet die weitere T-Zell-Entwicklung mittels positiver und negativer T-Zell-Rezeptorselektion statt (251, 252). Reife T-Zellen werden anhand ihrer Expression des Zelloberflächenmarkers funktionell in zwei Gruppen eingeteilt und zwar CD4⁺ und CD8⁺ (253). CD8⁺ T-Zellen interagieren spezifisch mit Peptiden des MHC-I Komplexes, CD4⁺ T-Zellen erkennen an MHC-Klasse-II

gebundene Peptide (254). Aus dem Thymus wandern die reifen T-Zellen in den Blutkreislauf und in die lymphatischen Organe ein, wo sie über ihre T-Zell-Rezeptoren Kontakt zu Antigenen von zuvor eingedrungenen Pathogenen bekommen und mittels Antigenpräsentierender Zellen aktiviert werden (255). CD4⁺ T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und tragen durch Zytokinproduktion zu Immunreaktionen bei (256). Innerhalb der T-Helferzellen lassen sich drei Gruppen unterscheiden: zum einen die TH1-Zellen, die u.a. IFN- γ produzieren, zum anderen die TH2-Zellen, die IL-5 oder IL-13 produzieren (257, 258). Des Weiteren wurden auch noch TH-17-Zellen beschrieben, die durch IL-17-Produktion gekennzeichnet sind und auf extrazelluläre Pathogene reagieren, sowie eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielen (259). CD8⁺ T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung zusätzlich zu der oben beschriebenen Selektion noch Stimuli von CD4⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen können als zytotoxische Zellen Perforin und Granzym ausschütten und die Apoptose von infizierten Zellen auslösen (260, 261). Nach der Beseitigung von Pathogenen beziehungsweise infizierten Zellen werden die T-Zellen über Apoptose eliminiert oder differenzieren sich zu Gedächtniszellen weiter (262).

8. Pathogene

In dieser Arbeit wurden bestimmte spezifische Pathogene verwendet, die hier kurz besprochen werden.

8.1. *Salmonella* Typhimurium

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) ist ein gramnegatives, fakultativ intrazelluläres Bakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Salmonellen können je nach Serotyp und Wirt sowohl eine Gastroenteritis als auch eine systemische Typhuserkrankung hervorrufen. *Salmonella* Typhimurium kann beim Menschen durch orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel eine akute Darmentzündung auslösen (263). Ein Virulenzfaktor, der besonders in der Anfangsphase der Infektion eine große Rolle spielt, sind die Geißeln auch Flagella genannt. Diese sind lange spiralförmige Fortsätze, die es dem Bakterium ermöglichen, sich in Flüssigkeiten

fortzubewegen und auf festen Oberflächen zu schwärmen. Diese sind unerlässlich um die Invasionsstelle, die *microfold* (M)-Zellen zu erreichen (264). Die M-Zellen sind in dem Follikel-assoziierten Epithel enthalten, das die Peyer-Plaques, eine Ansammlung von Lymphfollikeln, umgibt. Luminale Bakterien können mittels Transzytose von den M-Zellen auf die basolaterale Seite transportiert werden (263). Salmonellen verfügen über Pathogenitätsinseln (*Salmonella pathogenicity island* (SPIs)), genomische Abschnitte, die Virulenzfaktoren tragen und durch Wechselwirkungen mit dem Wirt dessen Abwehrmechanismen stören (265). SPI-1, das auf dem Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) codiert ist, ist hauptsächlich für das Eindringen beziehungsweise die Endozytose der Bakterien in die Epithelzellen des Darms verantwortlich (266, 267, 268). Die Invasion der Salmonellen in die Epithelzellen kann auch durch Unterbrechung der „*Tight Junctions*“ erfolgen (269). SPI-2 kodiert für ein weiteres Typ-III-Sekretionssystem, das nach der Überwindung der Darmepithelbarriere durch die Salmonellen eine wichtige Rolle spielt. Die Bakterien werden von Makrophagen phagozytiert und replizieren in einem vakuolären Kompartiment im Zytoplasma der *Salmonella containing vacuole* (SCV) (263, 270). Typhoidale Serovare der Salmonellen können so die Leber, Lunge und Lymphknoten erreichen (263). Ebenso können die Salmonellen durch CD18-exprimierende Fresszellen aus dem Magen-Darm-Trakt in die Blutbahn gelangen (271). Die Expression von entzündungsfördernden Zytokinen wird bei Kontakt mit extrazellulären Salmonellen mittels *Toll-like*-Rezeptoren vermittelt und intrazellulär durch *NOD-like*-Rezeptoren. Diese Rezeptoren, die auch als „Mustererkennungsrezeptoren“ bezeichnet werden, gehören der Familie der *pattern recognition receptors* (PRR) an, die Pathogene anhand ihrer spezifischen *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen können. Die Zytokinausschüttung (zum Beispiel IL-8) führt nachfolgend unter anderem zu der Rekrutierung von Neutrophilen (272). Nach einer Salmonelleninfektion konnten subletale DNA-Schäden beobachtet werden (8). Ebenso ist die Aktivierung des MAPK- und AKT-Signalwegs durch von *Salmonella enterica* sezernierten Effektoren beschrieben (273).

8.2. *Chlamydia muridarum*

Chlamydien sind obligat intrazelluläre, gramnegative Bakterien und gehören zur Familie der *Chlamydiaceae*. Beim Menschen ist *Chlamydia trachomatis* für Erkrankungen und Gewebeschäden des weiblichen Genitaltrakts verantwortlich. Das Aufsteigen der Chlamydien in den oberen Genitaltrakt kann schwerwiegende Folgen haben, wie unter anderem Unfruchtbarkeit, entzündliche Beckenerkrankungen und aus der Entzündung resultierende Eileiterschwangerschaften (274, 275). Als Tierinfektionsmodell wird die Infektion mit *Chlamydia muridarum* bei Mäusen verwendet (276), denn diese ähnelt der Pathogenese von *Chlamydia trachomatis* beim Menschen und gibt somit Aufschluss über immunologische Fragestellungen und entstehende Gewebeschäden.

8.2.1. Entwicklungszyklus der Chlamydien

Chlamydien durchlaufen einen biphasischen Entwicklungszyklus, das heißt, es existieren zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Formen, zum einen die infektiösen, aber nicht vermehrungsfähigen Elementarkörperchen (EB), zum anderen die nicht infektiösen, aber vermehrungsfähigen Retikularkörperchen (RB) (277, 278) (Abbildung 5). Die EBs sind lediglich 0,3 µM groß, und ihre Membran ist durch ein Netz von cysteinreichen Proteinen gekennzeichnet, die über Disulfidbrückenbindung verbunden sind (279). Diese Membranstruktur ermöglicht eine osmotische Stabilität und Resistenz gegenüber Belastungen der extrazellulären Umgebung. Mehrere bakterielle Adhäsine und Proteine sind für die Bindung und den Eintritt in die Wirtszelle notwendig (280). Dazu gehören Glykosaminoglykane (281, 282) das Oberflächenprotein *large cysteine-rich periplasmic* (OmcB) (283) das Hitzeschockprotein 70 (279), die *polymorphic membrane protein* Familie (PmpD) (284) und das Hauptprotein der äußeren mitochondrialen Membran (285), das an den Mannose-Rezeptor und den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bindet (286). Auf Seiten der Wirtszelle sind für den Eintritt in die Wirtszelle bedeutende Proteine das Epithelmembranprotein 2 (287), der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (288), der Östrogenrezeptorkomplex (289) und Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor. Die Proteindisulfidisomerase (290), ein Protein der Wirtszelle, ist an der Bindung der Bakterien und dem Eintritt der Elementarkörperchen beteiligt (291). Mittels des Typ-III-Sekretionssystems werden bakterielle Effektormoleküle durch

die Wirtsmembran in das Zytoplasma der Wirtszelle injiziert, sowie der Internalisierungsprozess des EBs im Endosom beziehungsweise Einschluss (*Inclusion*) initiiert (292, 293). Die Einschlüsse entstehen, indem EBs in membrangebundene Vakuolen aufgenommen werden, die fusionieren können. Bedeutend ist, dass das Bakterium den Einschluss so modifiziert, dass es vor dem lysosomalen Abbau durch die Wirtszelle geschützt ist (294). Innerhalb dieses Einschlusses differenzieren die EBs zu den Retikularkörperchen (295). Mittels Mikrotubuli der Wirtszelle werden die Chlamydien in die Peri-Golgi-Region transportiert (296). Dort interagieren die Chlamydien mit exozytotischen Vesikeln, um Lipide und diverse andere Stoffwechselprodukte aus der Wirtszelle zu gewinnen (297, 298). Die RBs replizieren sich asynchron durch binäre Spaltung innerhalb des Einschlusses und nach 48-72 h differenziert die Mehrheit der RBs wieder in EBs (277). Die EBs gelangen entweder durch Lyse der Zelle oder durch Extrusion (Ausschleusung der Chlamydien innerhalb ihrer Einschlüsse) in die extrazelluläre Umgebung (299, 300). Ebenso konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei einer gleichzeitigen Infektion mit *Herpes simplex* Viren die RBs in einen persistierenden Zustand in der Wirtszelle übergehen können (301).

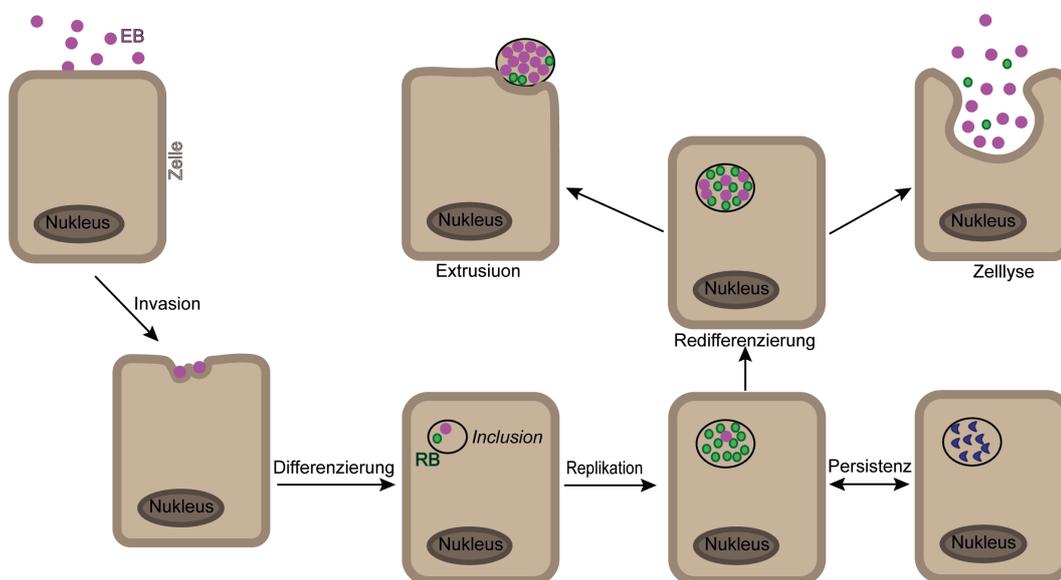


Abbildung 5: Entwicklungszyklus von *Chlamydia trachomatis/muridarum*

EBs (infektiös, nicht vermehrungsfähig) dringen mittels Endozytose in die Wirtszelle ein, wo sie innerhalb des Einschlusses (*Inclusion*) zu RBs differenzieren, welche nachfolgend replizieren können. Am Ende des Zyklus re-differenzieren die RBs wieder zu EBs und können nach der Zelllyse erneut Zellen infizieren oder sie werden mittels Extrusion aus der Zelle ausgeschleust. (Nach einer Vorlage von Dr. Svenja Barth, 2020).

8.2.2. Immunreaktion auf Chlamydieninfektion

Zu früheren Zeitpunkten der *C. trachomatis* oder *muridarum* Infektion kommt es zum Einstrom von Neutrophilen in das submuköse/muköse Gewebe (302). Die Ansammlung von Neutrophilen kann Epithelschäden fördern und die Barrierefunktion stören (303) sowie zu langfristigen Schäden beitragen (304). Es wurden diverse Rezeptoren beschrieben, wie zum Beispiel der *triggering receptors expressed on myeloid cells* (TREM-1), ein Rezeptor, der sich auf Monozyten und Neutrophilen befindet und zur Aktivierung führen kann (305, 306). Zu späteren Zeitpunkten kommt es zum CD4+ und CD8+ T-Zell Einstrom in das Entzündungsgebiet (303). Zytotoxische Lymphozyten verwenden Granzym B, um in Zielzellen Apoptose zu aktivieren (307). Zusätzlich kommt es zur Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-6 und GM-CSF der Epithelzellen (308).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände

Tabelle 1: Geräte und Gebrauchsgegenstände

Bezeichnung	Name	Firma
Chemilumineszenz-System	Intas ECL Chemocam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Durchflusszytometrie:	LSR Fortessa TM	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
	Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop	Keyence BZ-9000	Keyence Operation, Osaka, JPN
Homogenisierer	FastPrep [®] 24	MP Biomedicals GmbH, Eschwege, DE
Inkubatoren	Humidity chamber cell 240	Heraeus, Hanau, DE
	Incubator Hood TH 30	Thermo Fisher Scientific TM , Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop	Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikroplattenlesegerät	TECAN Spark 10M [®]	Tecan Group Ltd., CH
PCR Zyklus	T 3000 Thermocycler Biometra	Analytik Jena AG, Jena, DE
Sonikator	Biorupter Plus	Diagenode, Seraign, BEL
Spektralphotometer	Nanodrop	Thermo Fisher Scientific TM , Waltham, MA, USA
Thermomixer I	Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Thermomixer II.	QuantStudio TM 5	Thermo Fisher Scientific TM , Waltham, MA, USA
Western Blot Transfer System	Trans-Blot [®] Turbo TM Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Zellzähler	CASY [®] cell counter	Hoffmann La Roche, Basel, CH

Zentrifugen:	Mikrozentrifuge	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
	Multizentrifuge 3 SK Plus	Heraeus, Hanau, DE
	Multizentrifuge™ X3R	Heraeus, Hanau, DE
	Multizentrifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, DE
	Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, DE

1.2. Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung/ (CRISPR/Cas9 Mutante des Gens/ überexprimiertes Protein)	Bereitgestellt/ generiert durch	Name des enkodierten Proteins
HeLa 229 (Henrietta Lacks) Humane Zervixkarzinomzellen	ATCC Cat# CCL- 2.1	Prof. T. Rudel, Universität Würzburg,	-
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro CTRL3	non-targeting gRNA	J. Vier, IMMH Freiburg	-
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro APAF-1	APAF- 1/KIAA0413	C. Höfer, IMMH Freiburg	Apoptotic protease- activating factor 1
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro BAK	BAK1	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	Bcl-2 homologous antagonist/killer
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro BAX	BAX	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	Bcl-2-associated X protein
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro BAX gRNA5 Klon 19/BAK gRNA 1	BAX, BAK1	J. Vier, IMMH Freiburg	Apoptosis regulator BAX; Bcl-2 homologous antagonist/killer

HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro BCL-X _L	BCL-X _L	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	B-cell lymphoma- extra large
HeLa 229 pEF1-GW- puro-mBCL-X _L überexprimierend	BCL-X _L	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	B-cell lymphoma- extra large
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro CAD	CAD/DFFB/DFF2/ DFF40	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	Caspase- activated DNase
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro Caspase-8 gRNA A	CASP8	Dr. S. Gradzka- Boberda, IMMH Freiburg	Caspase-8
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro Caspase-9 gRNA 1	CASP9	Dr. S. Gradzka- Boberda, IMMH Freiburg	Caspase-9
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro Caspase-9 gRNA 2	CASP9	Dr. S. Gradzka- Boberda, IMMH Freiburg	Caspase-9
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro Mcl-1	MCL-1	Dr. C. Waguia Kontchou, IMMH Freiburg	Myeloid cell leukemia
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro PARL gRNA 2	PARL	Dr. S. Gradzka- Boberda, IMMH Freiburg	Presenilin- associated rhomboid-like protein
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro_ hCTRL sgRNA3/pTRH1- NFκB-mCMV- dscGFP	Basiert auf HeLa CTRL3 co- expressing pTRH1- NFκB-mCMV- dscGFP	Dr. I. Gentle, IMMH Freiburg	-
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro_ hBAX sgRNA 1 + hBAK sgRNA 1/ pTRH1- NFκB- mCMV-dscGFP	Basiert auf HeLa BAX/BAK dko gRNA 1 co- expressing pTRH1- NFκB-mCMV- dscGFP	Dr. I. Gentle, IMMH Freiburg	-

HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro SMAC gRNA 2	SMAC/DIABLO	Dr. A. Haimovici, IMMH Freiburg	Second mitochondria- derived activator of caspase/ Diablo IAP-binding mitochondrial protein
HeLa 229 lentiCRISPRv2_puro XIAP gRNA 1	XIAP	Dr. S. Gradzka- Boberda, IMMH Freiburg	E3 ubiquitin- protein ligase XIAP; X-linked inhibitor of apoptosis protein

1.3. Bakterien

Tabelle 3: Bakterien

Stamm	Bereitgestellt durch
<i>Chlamydia muridarum</i> MoPn (03DC39)	Dr. Konrad Sachse, Universität Jena, DE
<i>Salmonella</i> Typhimurium 18882 (s. enterica subsp. I serovar Typhimurium)	Patientenisolat aus dem Institut für Mikrobiologie der Universitätsklinik Freiburg

1.4. Antibiotika

Tabelle 4: Antibiotika

Name	Katalog Nummer	Hersteller
Ciprofloxacin	03277618 (PZN)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Gentamicin	15750-060	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA, USA
Penicillin/ Streptomycin	15140130	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, MA, USA
Vancomycin	-	Apotheke des Universitätsklinikums Freiburg

1.5. Antikörper

1.5.1. Primäre Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Name	Spezies/ Wirt	Verdünnung	Katalog- nummer	Firma
Phospho-Histon H2AX, polyklonal	Kaninchen	WB: 1:10.000	2557	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE
Phospho-p44/22 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	WB: 1:1.000	4370	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	WB: 1:1.000	4511	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE
Phospho-SAPK/ JNK (Thr183/Tyr 185)	Maus	WB: 1:1.000	9255	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE,
Phospho-NF-kB p65 (Ser536)	Kaninchen	WB: 1:1.000	3033	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE
Phospho-NF-kB p100/p52	Kaninchen	WB: 1:1.000	4882	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE
GAPDH Klon 6C5	Maus	WB: 1:20.000- 50.000	MAB374	Merck KGaA, Darmstadt, DE
α -Tubulin	Maus	WB: 1:30.000- 100.000	T9026	Sigma- Aldrich, Steinheim, DE
Aktive Caspase-3	Kaninchen	FACS: 1:400	559565	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Aktive Caspase-3	Kaninchen	FACS: 1:800	9446S	Cell Signaling Technology Europe, B.V. Frankfurt, DE

1.5.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Name	Spezies/ Wirt	Verdünnung	Katalog- nummer	Firma
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	WB: 1:5.000- 10.000	A6667	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Anti-Maus IgG- HRP	Ziege	WB: 1:2.000- 50.000	115-035- 166	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE
Anti-Maus IgG- Cy5	Esel	FACS: 1:500	715-175- 151	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE
Anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488	Esel	FACS: 1:500 Immunfl.: 1:400	711-545- 152	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE
Anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 647	Esel	FACS: 1:400	711-605- 152	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE

1.5.3. Antikörper für Immunzellfärbung (FACS Fortessa™)

Tabelle 7: Antikörper für Immunzellfärbung (FACS Fortessa™)

Antigen	Konjugat	Klon	Verdünnung	Firma
Biotin	V500	-	1:800	BD Bioscience, Heidelberg, DE
CD3	PE	154-2C11	1:200	BioLegend, San Diego, USA
CD4	FITC	100405	1:200	BioLegend, San Diego, USA
CD5	Biotin	53-7.3	1:400	eBioscience, Waltham, USA
CD16/32	-	2.4G2	1:400	BD Bioscience, Heidelberg, DE
CD11b	AF700	N418	1:400	BioLegend, San Diego, USA
CD11c	PE/Cy7	N418	1:500	eBioscience, Waltham, USA
CD19	Biotin	MB 19-1	1:200	eBioscience, Waltham, USA
CD45.2	FITC	47-0454	1:400	BioLegend, San Diego, USA

CD49a	PE	Ha31/8	1:200	BD Bioscience, Heidelberg, DE
CD64	PE	X54-5/7.1	1:100	BioLegend, San Diego, USA
CCR2	BV421	SA203G11	1:400	BioLegend, San Diego, USA
Eomes	ef660	Dan11mag	1:300	eBioscience, Waltham, USA
FcεR1α	Biotin	53-7.3	1:300	BioLegend, San Diego, USA
F4/80	Biotin	BM8	1:200	BioLegend, San Diego, USA
Ly6C	PerCP-Cy5.5	HK 1.4	1:1000	eBioscience, Waltham, USA
Ly6G	Biotin	1A8	1:400	BioLegend, San Diego, USA
NK 1.1	PE/Cy7	PK136	1:200	eBioscience, Waltham, USA
Streptavidin	V500	-	1:800	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
TCRβ	Biotin	H57-597	1:50	BioLegend, San Diego, USA
TCRβ	PerCP-Cy5.	H57-597	1:50	BioLegend, San Diego, USA
TCRγδ	Biotin	eBIOGL3	1:100	BioLegend, San Diego, USA
TNF	BV421	MP6-XT22	1:300	BioLegend, San Diego, USA
α-HSP	-	A57/B9	1:300	Enzo Life Science, Farmingdale, USA
Ziege-α- Maus	AF488	polyklonal	1:400	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE

1.6. Kommerzielle KITs

Tabelle 8: Kommerzielle KITs

Name	Firma
AccuStart™ II Mouse Genotyping Kit	Quanta Bioscience, Beverly, USA
Direct-zol Mini-Prep	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, DE
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6	BioLegend, San Diego, USA
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-8	BioLegend, San Diego, USA
Human CXCL1/GRO α	BioLegend, San Diego, USA
Foxp3 Transcription Factor staining Buffer set	eBioscience, Waltham, USA
NEBNext® Library Quant Kit for Illumina®	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, DE
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
TGX™ FastCast™ Acrylamide KIT, 12 %	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

1.7. Mäuse

Die Zucht und *in vivo* Experimente der Mäuse erfolgte in dem Mausstall des Departments für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene und/oder den Ställen der Zentralen Klinischen Forschung (ZKF) des Universitätsklinikums Freiburg. Die Arbeit mit den Mäusen wurde unter Einhaltung der geltenden nationalen und internationalen Gesetze/Verordnungen durchgeführt (TierSchG i.V.m TierSchVersV und Richtlinie 2010/63/EU).

Tabelle 9: Mausstämme

Name	Infos	Bereitgestellt durch
WT	C57BL/6NRj	Janvier, FR
<i>DIABLO/SMAC</i> ^{-/-}	Blastocyste aus Stamm C57BL/6N ES-Zellen aus C57BL/6N-A/a, parentale Sublinie IM8A3.N1	MPI of Molecular Cell Biology & Genetic, Department: Transgenic Core Facility, Dresden, DE
<i>DIABLO/SMAC</i> ^{+/-}	Heterozygote Wurfgeschwister im Rahmen der <i>DIABLO/SMAC</i> ^{-/-} Zucht	-

1.8. Primer für Genotypisierung der Mäuse

Tabelle 10: Primer für Genotypisierung der Mäuse

Name	Sequenz (5'- 3')
LAR3'	CAA CGG GTT CTT CTG TTA GTC C
3' arm	GAG CTT GCA AAC TAC TGG ATC AGG
Alt3 Diablo-5' arm	AGT GTA GCC CTG GCT ATC TAG G

1.9. Primer für RT-qPCR

Tabelle 11: Primer für RT-qPCR

Name	Sequenz (5'- 3') forward	Sequenz (5'- 3') reverse
CCL-2	CCT GCT GCT ACT CAT TCA CCA	ATT CCT TCT TGG GGT CAG CA
CCL-4	TTC CTG CTG TTT CTC TTA CAC CT	CTG TCT GCC TCT TTT GGT CAG
CCL-7	GAG GAT CTC TBC CAG GCT	ACA CCG ACT ACT GGT GAT CC
CXCL-1	CTG GGA TTC ACC TCAA GAA CAT C	CAG GGT CAA GGC AAC CCT C
CXCL-5	GTT CCA TCT CGC CAT TCA TGC	GCG GCT ATG ACT GAG GAA GG
CXCL-10	AAG TGC TGC CGT CAT TTT CT	GTG GCA ATG ATC TCA ACA CG
<i>C. muridarum</i>	GCC GTT TTG GGT TCT GCT T	CGA GAC GTA GGC TGA TGG C

1.10. Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Inhaltsstoffe
Permeabilisierungspuffer für Immunfluoreszenz	1x PBS 0,2 % Triton X-100
Waschpuffer/Puffer fürs Blockieren/Puffer für Antikörperverdünnung für Immunfluoreszenz	1x PBS 1 % BSA 0,2 % Triton X-100

	0,1 % TWEEN 20
50x TAE-Puffer	242 g Tris Base (in 500 mL MiliQ H ₂ O) 100 mL 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0 57,1 mL Eisessig-Säure bis 1 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
Puffer fürs Blockieren (WB)	5 % Milch 1x TBS-T
Ponceau S (WB)	0,1 % (Ponceau S) 5 % Essigsäure in deionisiertem Wasser
20x TBS-Puffer	320 g NaCl 96,8 g Tris Base (x) bis pH 7,6 HCl bis 2 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
1x TBS-T-Puffer	500 mL 20x TBS 5 mL TWEEN 20 bis 10 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
Transfer-Puffer Tris-Glycin	60,6 g Tris Base 288 g Glycin bis 2 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
1x BioRad-Transfer-Puffer	200 mL 5x Transfer Puffer 600 mL Ethanol 200 mL MiliQ H ₂ O
Transfer-Puffer Tris-Glycin	60,6 g Tris Base 288 g Glycin bis 2 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
1x Running-Puffer (WB)	200 mL 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad) bis 2 L mit MiliQ H ₂ O auffüllen
4x Tris HCl/SDS-Puffer	6,05 g Tris Base 100 mL Tris Base x – bis pH 6,8 HCl 0,4 g SDS
2x SDS Laemmli-Puffer	50 mL 4x Tris HCl/SDS-Puffer 80 mL Glycerol 12 g SDS 6,2 g DTT 2 mg Bromphenol blau

	Bis 200 mL mit MilliQ H ₂ O auffüllen
6x Laemmli-Puffer + DTT	7 mL 4x Tris HCl/SDS-Puffer (pH 6,8) 3 mL Glycerol 1 g SDS 0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenol blau bis 10 mL mit MilliQ H ₂ O auffüllen
PBS für ELISA	43,85 g NaCl 11,95 g Na ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O 1,5 g NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O VE-H ₂ O 5 L, pH wurde mit KOH angepasst um pH 7,2 zu erreichen
Waschpuffer für ELISA	500 mL PBS 250 µL TWEEN 20
Waschpuffer (PBS/BSA) für aktive Caspase-3-Färbung (FACS)	1x PBS 0,5 % BSA
Waschpuffer (PBS/BSA/Saponin) für aktive Caspase-3-Färbung (FACS)	1x PBS 0,5 % BSA 0,5 % Saponin
FACS-Puffer für Immunzellfärbung	500 mL PBS 2 % FCS
Verdauung für Genitaltraktsuspension (FACS)	HBSS 4 % FCS 0,5 mg/L Kollagenase D 0,5 mg/mL DNase I 0,5 U/mL Dispase
Sucrose-Phosphat-Glutamat (SPG)-Puffer	200 mM Sucrose 17,4 mM Na ₂ HPO ₄ 2,6 mM NaH ₂ HPO ₄ 4,89 mM L-Glutamin Säure pH 7,4

1.11. Medien und Zusatzstoffe für Zellkultur

Tabelle 13: Medien und Zusatzstoffe für Zellkultur

Name	Katalognummer	Firma
DMEM, <i>high</i> Glukose	41965062	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
PBS, kein Kalzium, kein Magnesium	41965063	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
FCS	F7524	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
LB-Medium	-	IMMH, Freiburg, DE
RPMI 1640; GlutaMAX	61870044	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Trypsin Neutralisationslösung	CC-5002	Lonza Group AG, Basel, CH
0.05 % Trypsin-EDTA (1x), Phenol rot	25300096	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA

1.12. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 14: Chemikalien und Reagenzien

Name	Katalognummer	Firma
10x Tris7 Glycin/SDS	1610772	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
123 count™ eBeads Counting Beads	01-1234-42	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
2N H ₂ SO ₄	X873.1	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
ABT-737	S1002	Selleck Chemicals GmbH, München, DE
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN 2232	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
APS (Ammonium persulfate)	A3678-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bovines Serum Albumin (BSA) fraction V, US origin, lyophilized powder	P06-1391500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Bromphenol blau Natrium	B5525-5G	Merck KGaA, Darmstadt, DE
CASY® ton	05651808001	Roche, Basel, CH
Kollagenase D	11088866001	Roche, Basel, CH

DAPI (4',6-diamidino-2 phenylindol)	D9542-5MG	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Desoxyribonuklease (DNase) I aus dem Rinder Pankreas	DN25-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dimethylsulfoxid DMSO	D2650	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dithiothreitol (DTT)	A2948,0025	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
PBS (10x)	17-515F	Lonza Group AG, Basel, CH
EDTA Lösung, pH 8, 0.5M	A4892	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	32205_1L	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromidmonoazid (EMA)	E2028-5MG	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Fixable Viability Dye eF780	65-0865-14	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Glyzerol	3783.1	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	14175-053	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
H ₂ PO ₄	215104	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
IBIDI mounting Media	50001	Ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	T9281-25ML	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nonfat dried milk powder	A0830	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Normal melting agarose	11404	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Nuklease-freies Wasser	R0582	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Nunc Immuno Platte	439454	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
PageRuler™, prestained protein ladder 10-180 kDa	26616	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Paraformaldehyd 32 %	100504-858	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Paraformaldehyd 4 %	11762.00500	Morphisto, Offenbach, DE
Percoll®	17-0891-01	GE Healthcare, Solingen, DE

Ponceau S	5938.2	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Protein assay reagent A	500-0113	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Protein assay reagent B	500-0114	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Protein assay reagent S	500-0115	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Q-VD-OPh	HY12305-25mg	Hycultec GmbH, Beutelsbach, DE
S63845 (Mcl-1-Inhibitor)	S8383	Selleck Chemicals GmbH, München, DE
Saponin	4185.1	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
SAYANA (Medroxyprogesteronazetat)	-	Apotheke des Universitätsklinikums Freiburg, DE
SDS pellets	CN30.2	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Natriumazetat, pH 5,5	AM9740	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Natriumchlorid	9265.1	Carl ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Natriumzitat	W302600- SAMPLE- K	Merck KGaA, Darmstadt, DE
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrat	34094	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszent Substrat	34580	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
SYBR Select Mastermix	4472918	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
SYTOXGreen	S7020	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Thermo Scientific™ dNTP Mix (10 mM)	R0191	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Trans-Blot Turbo 5x Transferpuffer	10026938	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi Nitrocellulose Membran	1704271	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

TRI Reagent [®]	R2063	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trizma [®] base (Tris)	T1503- 1KG	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TWEEN [®] 20	P2287- 100ML	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Whatman paper	10427818	VWR International, Radnor, USA
Z-VAD (OMe)-FMK	Hy16658	Hycultec GmbH, Beutelsbach, DE

1.13. Computerprogramme

Tabelle 15: Computerprogramme

Name	Firma
Adobe Illustrator [®] v27.6	Adobe
BZ-X v2.2	Keyence
EndNote 20	Microsoft
Excel v2010	Microsoft
FlowJo [™] v10.6.2	BD Bioscience
GraphPad PRISM v7.02	GraphPad
ImageJ v1.48	National Institute of Health
Magellan Data Analysis software	Tecan
QuantStudio 5 v1.5.1	Applied Biosystems
Word v16.74	Microsoft
Zen v9.2.0.0	Zeiss

2. Methoden

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Kultivierung diverser Zelllinien

Die HeLa 229 Zellen stellen menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms dar. Diese wurden abhängig ihrer Teilungsgeschwindigkeit passagiert. Dafür wurde der Medienüberstand von der 145mm Zellkulturplatte abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen, welches im Anschluss ebenfalls abgesaugt wurde. Danach wurde 2,5 mL Trypsinlösung auf die Zellen gegeben, wodurch die Adhärenzproteine, die den Zellen die Anheftung an den Boden der Platte ermöglichen, gespalten werden konnten. Die Zellkulturplatte wurde dafür 5 min bei 37°C in den Brutschrank gegeben. Anschließend wurden die durch Trypsin gelösten Zellen in 10 mL RPMI-Medium + 10 % FCS aufgenommen und mit dem Zellzähler (CASY®) gezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde in frischem RPMI-Medium + 10 % FCS auf eine neue Zellkulturplatte ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.2. Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren der HeLa-Zellen wurden diese wie unter Punkt III 2.1.1 beschrieben erst gewaschen, dann trypsiniert und anschließend in RPMI-Medium + 10 % FCS in einem 15 mL Röhrchen aufgenommen. Dieses wurde für 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 mL 90 % FCS + 10 % DMSO aufgenommen und für 24 h bei -80°C eingefroren, bevor es in den Flüssigstickstoff von -176°C überführt wurde.

2.1.3. Auftauen von Zellen

Für das Auftauen wurden die im Flüssigstickstoff eingefrorenen Kryoröhrchen entnommen und die darin enthaltenen Zellen (1 mL) in 9 mL RPMI-Medium + 10 % FCS in ein 15 mL Falcon Röhrchen aufgenommen. Dieses wurde für 5 min bei 1500 rpm RT zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in RPMI-Medium + 10 % FCS resuspendiert und in eine neue 145 mm Zellkulturplatte überführt.

2.1.4. Stimulation der Zellen mit Inhibitoren

Für die Stimulation der HeLa-Zellen mit diversen Inhibitoren wurden diese mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in RPMI-Medium + 10 % FCS aufgenommen und gezählt, wie unter III 2.1.1 beschrieben. Für eine Stimulationsdauer von 48, 54 oder 72 h wurden 150.000 Zellen/ mL, für eine Stimulationsdauer von 2 und 5 h wurden 350.000 Zellen/ mL in einer 6-*well*-Platte ausplattiert und für 3 h bei 37°C in den Brutschrank gegeben. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und ein Mastermix, in der jeweiligen Konzentration des Inhibitors (0,25 mM S63845, 10 mM ABT-737, 10 mM QVD-Oph, 20 mM Z-VAD-FMK) in RPMI + 10 % FCS-Medium angefertigt und auf die Zellen für die Stimulation gegeben. Die Platte wurde nun für die gewünschte Stimulationsdauer bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Nach der Bebrütung konnte aus dem Überstand eine ELISA-Messung sowie eine Fixierung der Zellen erfolgen, die nachfolgend für eine FACS-Färbung verwendet werden konnte. Um eine ELISA-Messung aus den Proben zu ermöglichen, wurde der Überstand abgezogen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, welches für 5 min bei 500 g zentrifugiert wurde. Anschließend konnte der Überstand für die ELISA-Messung verwendet werden. Die verbliebenen Zellen in der Platte wurden mit 500 µL PBS gewaschen, trypsinisiert (250 µL) und in RPMI-Medium + 10 % FCS (350 µL) aufgenommen und in einem Eppendorf-Röhrchen gesammelt. Für 5 min und bei 500 g wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in 500 µL PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet in 100 µL 4 % Paraformaldehyd + 100 µL PBS für 15-30 min bei RT fixiert. Zuletzt wurde das Zellpellet erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun für maximal 7 Tage bei 4°C gelagert werden oder direkt im Anschluss für den Durchflusszytometer gefärbt werden.

2.1.5. Herstellung von Zelllysaten in 1x Laemmli-Puffer

Die stimulierten Zellen (350.000 Zellen/mL) wurden nach den gewünschten Inkubationszeitpunkten (2, 5, 24 h) direkt in der 6-*well*-Platte lysiert. Dafür wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen und in 200 µL 1x Laemmli-Puffer lysiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95°C abgekocht und im Biorupter Plus für 4 Zyklen (30 sek on, 30 sek off) sonifiziert,

um DNA-Strangbrüche zu erzeugen. Danach wurden die Proben entweder direkt in ein Acrylamid Gel pipettiert oder bei -20°C gelagert.

2.1.6. Enzyme-Linked Immunsorbent Assay (ELISA)

Das *Enzyme-Linked Immunsorbent Assay* (ELISA) stellt ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren dar, wodurch diverse Zytokine nachgewiesen werden können. Die Proben (Überstand siehe Punkt III 2.1.4) wurden für die Messung von Interleukin-6, 8 und CXCL-1 mit dem jeweiligen Kit (ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-6/8, Human CXCL1/GRO α) verwendet. Das Protokoll erfolgte wie in der Herstelleranleitung beschrieben. Am Ende konnte die Zytokinexpression mit dem TECAN Gerät gemessen und in Excel ausgewertet werden.

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. In vitro Salmonelleninfektion

Die gefrorenen Salmonellen (*Salmonella* Typhimurium) wurden vor dem Start der Experimente mit einer Öse auf einer LB-Platte mittels dem 3-Ösen-Ausstrich ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht (24 h) im 37°C Raum bebrütet, ehe sie für die weitere Aufbewahrung (maximal 14 Tage) in einem 4°C Kühlraum gelagert wurde. Am nächsten Tag wurde eine Salmonellen-Kolonie von der Platte auf eine neue LB-Platte ausgestrichen, damit kein Glycerol mehr im Ausstrich vorhanden war. Die Bebrütung erfolgte wieder für 24 h bei 37°C . Am Tag 0 des Experiments wurde eine Salmonellenkolonie in 3 mL LB-Medium in ein 15 mL Röhrchen überführt. Dieses wurde für 16 h bei 37°C bei kontinuierlichem Schütteln von 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde von der Bakteriensuspension eine Verdünnung 1:31 (500 μL Bakteriensuspension + 15 mL LB-Medium) angesetzt und für 3 h bei 37°C in einen Brutschrank gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde in einer Küvette (900 μL Medium + 100 μL „Übertag-Bakteriensuspension“) die OD der Bakteriensuspension gemessen. Benötigt wurde eine OD₆₀₀ von 0,5, entspricht einer MOI von 50, um dies zu erreichen wurde nach dem jeweils gemessenen Wert eine dafür benötigte Verdünnung angesetzt. Den zuvor ausplattierten Zellen (300.000/ mL in einer 6-well-Platte) wurde 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ der verdünnten Bakteriensuspension (MOI50) hinzugegeben und für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium mit der

enthaltenen Bakteriensuspension verworfen und 50 µg/mL Gentamicin auf die Zellen gegeben und für 40 min bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Im Anschluss daran wurde erneut das antibiotikahaltige Medium abgesaugt und 5 µg/mL Gentamicin auf die Zellen gegeben und bis zu dem gewünschten Erntezeitpunkt bei 37°C im Brutschrank gelagert. Nach der gewünschten Inkubationszeit konnte der gefilterte Überstand für eine ELISA- Messung (siehe III 2.1.6.) verwendet werden und oder die Zellen in 1x Laemmli-Puffer lysiert und für einen nachfolgenden Western Blot (siehe III 2.3.2) verwendet werden.

2.2.2. In vivo *Chlamydia muridarum* Infektion

Um den Zyklus der zu infizierende Mäuse zu synchronisieren, wurde diesen jeweils drei und zehn Tage vor der Infektion 2,5 mg Medroxyprogesteronazetat subkutan verabreicht. Mittels einer Pipette wurden die Mäuse mit 5×10^5 IFU *Chlamydia muridarum* intravaginal infiziert, welches in 20 µL PBS gelöst wurde. Uninfizierte Kontrollmäuse wurden ebenfalls mit 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat vorbehandelt und statt der *Chlamydia muridarum* Lösung wurde ihnen nur 20 µL PBS intravaginal gespritzt. Vier Tage nach der Infektion wurde vaginal ein Abstrich den Mäusen entnommen und in ein Röhrchen mit 1 mL SPG + Gentamicin + Doxycyclin gegeben. Der Abstrich diente als Nachweis für die Chlamydienlast und wurde bei -80°C bis zu dem Tag der Analyse gelagert. Der Abstrich diente als Kontrolle über eine erfolgreiche Infektion.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.3.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)

Mittels eines Polyacrylamidgels wurden die Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proben wurden zuvor in 1x Laemmli-Puffer, wie unter Punkt III 2.1.5 beschrieben, lysiert. Das in dem Puffer enthaltene SDS war notwendig, damit die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufwiesen. Die Substanzen für das 12 % Polyacrylamidgel wurden nach Anleitung zusammen mit TMED und 10 % APS gemischt und in eine Gelkammer überführt. Im Anschluss daran wurde ein Kamm eingeführt, damit in die nun entstehenden Taschen die späteren Proben pipetiert werden konnten.

Nach 45–60 min war das Gel auspolymerisiert. Danach wurden 20 µL, der lysierten Proben in die Geltaschen aufgetragen. Die Proteine des Gels wurden bei konstanten 180V für 45 min in 1x Tris/Glyzin/SDS-Puffer aufgetrennt.

2.3.2. Western Blot

Western Blot beschreibt die Übertragung, der aufgetrennten Proteine mittels eines Acrylamidgels auf eine Nitrocellulosemembran. Das Trans-Blot Turbo System gehört zum Semi-trockenen Transferverfahren. Dieses besteht aus einer Trans-Blot Turbo-Kammer und zwei Transferkassetten mit einer Anode und Kathode. Der 5x Transferpuffer wurde mit 600 mL MilliQ Wasser und 200 mL Ethanol zu 1x Transfer-Puffer gelöst. Die Membran wurde zuerst in 1x TBS-T aktiviert, bevor ein Transfersandwich, bestehend aus weiteren zwei mit 1x Transfer-Puffer benetzten Filtern und dem Gel, gefertigt wurde. Das Programm „*Mixed molecular weight*“, dass Proteine im Bereich von 5-150 kDa transferiert, wurde ausgewählt. Nach dem Transfer wurde die Membran in MilliQ- Wasser und TBS-T gewaschen, bevor eine Ponceau-Färbung durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Membran in 5 % Milch gelegt, um unspezifische freie Bindungsstellen zu blockieren.

2.3.3. Immundetektion durch spezifische Antikörper

Um die Expression von MAP-Kinasen, der phosphorylierten Histonvariante H2A.X (γ H2AX) oder NF- κ B zu ermitteln, wurde die Membran mit der jeweiligen Verdünnung des primären Antikörpers (siehe Tabelle 5) in 5 % BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 24 h wurde die Membran 3x für jeweils 10 min in 1x TBS-T gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6), welcher spezifisch den Primärantikörper binden konnte, in 5 % Milch für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal gewaschen, um danach die Proteinexpression mit dem Intas ECL Chemocam Imager Gerät zu detektieren.

2.4. Genotypisierung der Mäuse

Für die Genotypisierung der DIABLO/Smac-defizienten Mäuse wurde die DNA aus den zuvor gestanzten Ohrstücken mit dem „AccuStart II Mouse Genotyping Kit“ isoliert, indem den Ohrstücken 50 µL „DNA extraction buffer“ hinzugegeben wurde und diese für 30 min bei 95°C gekocht wurden. Anschließend wurde 50 µL „stabilization buffer“ hinzugefügt. Anschließend wurde 1 µL des isolierten DNA-Produkts den Primern (Tabelle 10) zugegeben und eine PCR mit den unter Tabelle 16 beschriebenen Konditionen durchgeführt.

Tabelle 16: PCR-Konditionen für Maus-Genotypisierung (*DIABLO*^{-/-})

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
94	3 min	1x
94	30 sek	35x
62	30 sek	
72	1 min	
72	3 min	1x
16	Pause	-

15 µL der PCR-Produkte wurden mittels eines 2 % Agarosegels bei konstanten 120V für 1 h aufgetrennt. Die Wildtyp Allele zeigten eine DNA-Bande bei 300 bp, wohingegen die Smac-defizienten Allele eine DNA-Bande bei 550 bp zeigten.

2.5. RNA-Isolation aus dem Genitaltrakt

Um die Expression der Chemokine im infizierten Genitaltrakt zu ermitteln, wurde RNA aus dem zuvor infizierten Genitaltrakt isoliert. Dafür wurden die Mäuse wie unter Punkt III 2.2.2 beschrieben infiziert und 24 h nach der Infektion mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss wurde der Genitaltrakt vorsichtig herauspräpariert und in 4 Teile (Ekto-, Endozervix, Uterushorn I und II) unterteilt. Die einzelnen Organteile wurden mit einer Feinwaage gewogen und in ein Röhrchen, bestückt mit einer Kugel, gegeben. In dieses Röhrchen wurde 1 mL Trizol unter dem Abzug hinein pipettiert und im Homogenisierer (2 Zyklen à 20 sek) wurde das Organstück zerkleinert.

Anschließend wurde das KIT „Direct-zol Mini-Prep“ für die RNA-Isolation verwendet und die Schritte erfolgten, wie in der vom Hersteller beigelegten Anleitung, beschrieben.

2.6. Umschreiben der RNA in cDNA

Das „RevertAid First Strand cDNA Synthesis KIT“ wurde verwendet, um die zuvor isolierte RNA (2.5) in cDNA mittels Oligo-DT-Primer umzuschreiben.

2.7. RT-qPCR zur Messung von Chemokinen

Die *real-time quantitative PCR* (RT-qPCR) wurde für den Nachweis bzw. die Quantifizierung von Nukleinsäuren benötigt. 100 ng cDNA (2.6) wurden für die RT-qPCR unter folgenden Bedingungen verwendet (Tabelle 17 und Tabelle 18)

Tabelle 17: Komponente für Herstellung von cDNA aus FGT der Maus für den Nachweis der Chemokinexpression mittels RT-qPCR

Komponente	(μL)
SYBR Select Master MIX (2x)	5
Primer forward	0,5
Primer reverse	0,5
cDNA Template (100 ng/ μL)	1
Nuklease-freies Wasser	3
total	10

Tabelle 18: PCR-Konditionen zum Nachweis der Chemokinexpression

Schritte	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit	Zyklen
UDG-Aktivierung	50	2 min	1
Polymerase Aktivität	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 sek	45
„Annealing“	60	1 min	
Schmelzkurve	95	15 sek	1
	60	1 min	
	95	15 sek	

2.8. RT-qPCR zum Nachweis von *C. muridarum*

Für die quantitative Analyse von *C. muridarum*-Genomkopien aus dem Genitaltrakt infizierter Mäuse, erfolgte das Ansetzen eines Standards. Dafür wurde das Volumen einer definierten Anzahl von *C. muridarum* IFUs in 500 µl SPG gegeben und zentrifugiert (17.000 xg, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 180 µl ATL-Puffer plus 20 µl Proteinase K aus dem DNeasy®-Kit resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien 1 h lang bei 56°C lysiert und die anschließende DNA-Isolierung erfolgte gemäß dem DNeasy-Protokoll. Nach der Isolierung wurde die DNA-Konzentration mit einem Spektralphotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde eine 10-fache serielle Verdünnung der Chlamydien-DNA hergestellt und die RT-qPCR wurde in einer 384-well-Platte durchgeführt (Tabelle 19 und Tabelle 20).

Tabelle 19: Komponente für RT-qPCR für *C. muridarum* Standard

Komponente	(µL)
SYBR Select Master MIX (2x)	5
Primer <i>C. muridarum</i> forward	0,5
Primer <i>C. muridarum</i> reverse	0,5
DNA Template (100 ng/µL)	4
total	10

Tabelle 20: RT-qPCR-Konditionen für die Detektion von *C. muridarum* Genomkopien

Schritte	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
UDG-Aktivierung	50	2 min	1
Polymerase Aktivität	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sek	45
„Annealing“	60	18 sek	
„Extension“	72	18 sek	
Schmelzkurve	95	15 sek	1
	50	30 sek	
	95	15 sek	

Nach der DNA-Isolation aus dem Genitaltrakt (2.5) konnte mittels RT-qPCR der Nachweis über die vorliegende Chlamydienlast erfolgen. Dafür wurden die Primer aus Tabelle 21 und die RT-qPCR-Zyklen aus Tabelle 20 verwendet. Die Ct-Werte und die entsprechenden Gewebegewichte wurden verwendet, um Chlamydien-Genomkopien pro mg Gewebe anhand der Gleichung der Standardkurve zu bestimmen.

Tabelle 21: Komponente für DNA für RT-qPCR zum Chlamydien Nachweis

Komponente	(μL)
SYBR Select Master MIX (2x)	5
Primer <i>C. muridarum</i> forward	0,5
Primer <i>C. muridarum</i> reverse	0,5
DNA Template (100 ng/ μ L)	2
Wasser	2
total	10

2.9. Nachweis von *C. muridarum* aus vaginalem Abstrich

2.9.1. Infektion der HeLa-Zellen mit *C. muridarum* aus dem Abstrich

HeLa 229 WT-Zellen wurden mit der Konzentration 1.5×10^5 in 1 mL in einer mit Deckgläschen bestückten 12-well-Platte für 24 h ausgesetzt. Am nächsten Tag wurde der zuvor entnommene vaginale Abstrich von den infizierten Mäusen für 30 sek gut „gevortext“ und dann bei 200 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Röhrchen überführt und sowohl 30 als auch 10 μ L auf die zuvor ausgesetzten HeLa-Zellen gegeben. Anschließend wurde die 12-well-Platte für 1 h bei 37°C bei 200 g zentrifugiert, damit die in dem Überstand befindlichen Chlamydien die Zellen optimal infizieren konnten. Die Zellen wurden dann für 15-18 h, je nachdem ab wann die *Inclusion* der Chlamydien unter dem Mikroskop erkennbar waren, bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 500 μ L 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

2.9.2. Immunfluoreszenzfärbung der Einschlüsse von *C. muridarum*

Nach der Fixation wurden die Zellen für die weitere Färbung mit 500 µL 0,2 % Triton X-100 in PBS für 30 min permeabilisiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde nach dem Entfernen von Triton X-100 die Zellen in 1 mL 5 % BSA für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem Antikörper anti-HSP60 (1:300 in 5 % BSA verdünnt) für 30 min inkubiert, um später die Chlamydien detektieren zu können. Danach erfolgte wieder ein Waschvorgang mit PBS. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Ziege gegen Kaninchen konjugiert mit AF488 1:500 in 5 % BSA verdünnt. Die Zellen wurden mit dem Sekundärantikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Erneut folgte ein Waschschriff mit PBS, um danach die DNA anfärben zu können. Dafür wurde Hoechst in PBS so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 1,5 µg/mL für 15 min auf die Zellen gegeben werden konnte. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor das Deckgläschen mittels „PermaFluor mounting media“ auf einem Objektträger fixiert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert wurde.

2.9.3. Berechnung der IFU/mL

Für die Berechnung der Infektiösen Einheit (IFU) pro ml von *Chlamydia muridarum* wurden jeweils 10 Bilder von einem Deckgläschen mit dem Fluoreszenzmikroskop (BZ-9000, Keyence) gemacht. Mittels des Computerprogramms BZ-II- Analyser und der 40-fachen Vergrößerung (40x) konnten die Zellkerne und die Chlamydieneinschlüsse dargestellt und analysiert werden. Folgende Rechnung wurde verwendet, um die IFU/ mL der einzelnen Proben zu ermitteln.

$$\text{IFU/mL} = \frac{(\text{Ø Anzahl der Einschlüsse} * \text{Anzahl der Felder pro Deckglas})}{\text{Volumen der Inokulation}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.10. Isolation der Immunzellen aus dem murinen Genitaltrakt

Der Genitaltrakt wurde den zuvor getöteten Mäusen vorsichtig heraus präpariert. Dieser wurde in 3 Teile (Uterushorn I, Uterushorn II und Ovidukt + Ovar) zerteilt

und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Das Gewebe wurde jeweils in 5 mL Verdaulösung (4 % FCS, 0,5 mg/mL Kollagenase D, 0,5 U/mL Dispase und 0,5 mg/mL DNase I in HBSS) aufgenommen und bei 37°C bei 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Verdaulösung des Gewebes für 30 sek „gevortext“ und durch ein 70 µm kleines Sieb in ein neues Röhrchen filtriert. Die Lösung in dem Röhrchen wurde auf Eis gestellt und das Gewebe aus dem Sieb erneut in 5 mL der Verdaulösung in das alte Röhrchen aufgenommen für einen erneuten Verdau- und Filtrationsschritt. Dieses Vorgehen des Gewebeverdaus erfolgte insgesamt dreimal. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension des verdauten Gewebes für 10 min bei 1300 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL 40 % Percoll Lösung resuspendiert. Die in der 40 % Percoll Lösung enthaltenen Zellen wurden langsam auf eine 80 % Percoll Lösung in einem neuen Röhrchen zur Schichtung pipettiert. Die Proben wurden dann bei 4°C für 20 min mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Nun wurde eine Phasenbildung erkennbar, welche es ermöglichte die Lymphozyten (Interphase) von den restlichen Zellbestandteilen und den beiden Percollschichten zu entnehmen und in ein neues Röhrchen zu überführen. Die nun isolierten Zellen wurden in 11 mL FACS-Puffer (PBS + 2 % FCS) resuspendiert und für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpellet erneut in FACS-Puffer resuspendiert und in eine 96-well-Platte überführt. Nun konnten die Zellen fixiert und für den Durchflusszytometer gefärbt werden.

2.11. Durchflusszytometrie

2.11.1. Oberflächenfärbung der Immunzellen

Bevor die Oberflächenfärbung der Immunzellen vorgenommen wurde, wurden diese mit einem „LIVE/DEAD Fixable Viability“ Antikörper (1:250) in Kombination mit einem anti-CD16/32 Antikörper (1:300) in FACS-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert. Diese Inkubation wurde benötigt, um tote Zellen später bei der Auswertung mittels einer erfolgten Definierung (*gating*) dieser im FlowJo Programm auszuschließen und eine unspezifische FcγRIII/FcγRII-Bindung zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm bei 4°C mit FACS-Puffer gewaschen. Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen für 30 min mit einer entsprechenden Kombination von verdünnten Antikörpern (Tabelle 7) in FACS-Puffer auf Eis inkubiert. Damit später Antikörper anderer Linien

ausgeschlossen werden konnten, wurden biotinylierte Antikörper mit in die Oberflächenantikörperkombination gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen wurden für 15 min mit einem Streptavidin Antikörper, welcher spezifisch gegen Biotin gerichtet ist, inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und anschließend in 4 % Paraformaldehyd für 1 h auf Eis fixiert. Nach der Fixation wurden die Zellen zweimal gewaschen und konnten für eine weitere intrazelluläre Färbung permeabilisiert werden.

2.11.2. Intrazelluläre Färbung der Immunzellen

Nach der Oberflächenfärbung und Fixation der Zellen wurden diese über Nacht bei 4°C in einer entsprechenden Kombination von verdünnten Antikörpern im Permeabilisierungspuffer (Foxp3 Transcription Factor staining Buffer set) inkubiert (Tabelle 7). Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und anschließend in 200 µL FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt.

2.11.3. Zählung der isolierten Immunzellen

Für die Zählung der Zellen aus dem Genitaltrakt wurde „123 countTM eBeads Counting Beads“ als Referenzzellen verwendet. 100 µL der isolierten Zellsuspension wurde mit dem Antikörper gerichtet gegen CD45 für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 4 % Paraformaldehyd für 1 h fixiert. Nach der Fixation wurden die Zellen erneut gewaschen und in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen. Ein definiertes Volumen von den Referenzzellen wurde den zuvor in FACS-Puffer aufgenommenen Zellen hinzugefügt und am Durchflusszytometer gemessen. Die Zellzählung wurde benötigt, damit die absolute Zellzahl der isolierten Immunzellen ermittelt werden konnte.

$$\text{Absolute Zahl (Zellen/}\mu\text{L)} = \frac{(\text{Zellzahl} \times \text{eBead(Volumen)})}{(\text{eBead (Zahl)} \times \text{Zellvolumen})} \times \text{eBead-Konzentration}$$

2.11.4. Messung der Immunzellen via FACS Fortessa™ und Auswertung mittels FlowJo

Nach der oberflächen- und Intrazellulär-Färbung wurden die Zellen in 200 μ L FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer LSR Fortessa™ gemessen und anschließend mit dem Programm FlowJo ausgewertet.

Mittels folgender „Gating“ Strategie wurden die myeloiden Zellen definiert (Abbildung 6).

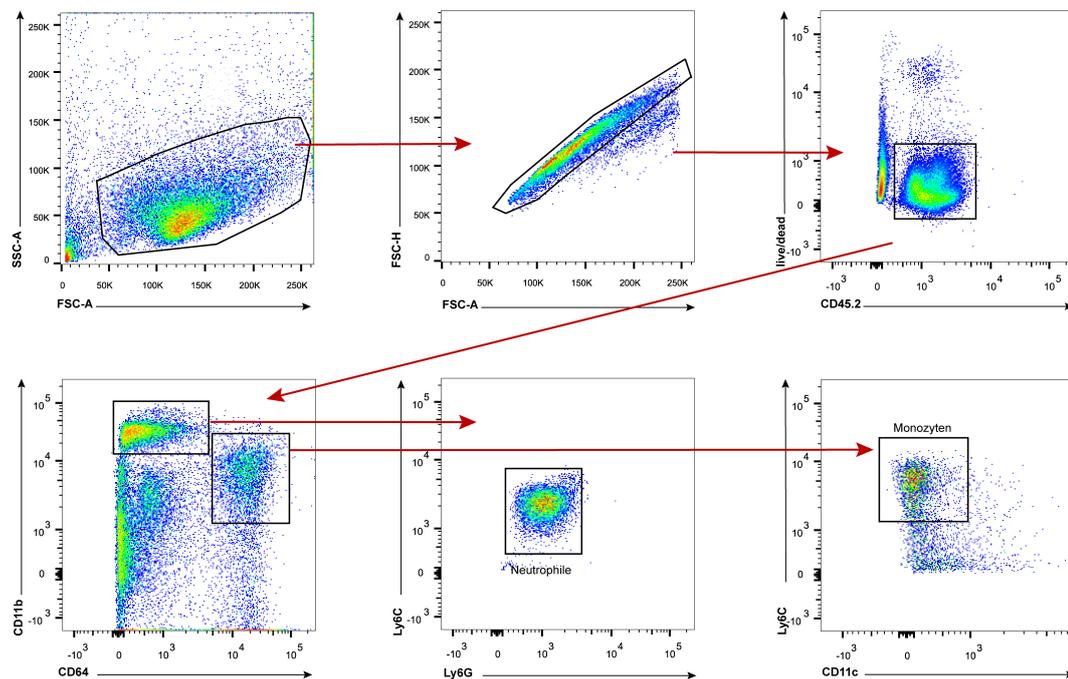


Abbildung 6: Identifizierung der myeloiden Zellen aus dem murinen Genitaltrakt

Mäuse, die mit 5×10^5 IFU *C. muridarum* infiziert wurden, wurde der Genitaltrakt entnommen, enzymatisch verdaut und die Immunzellen isoliert. Mittels Antikörper wurden die myeloiden Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Die neutrophilen Granulozyten wurden definiert als CD45+, CD11b+, CD64-, Ly6C+, Ly6G+. Monozyten wurden definiert als CD45+, CD11b+, CD64+, Ly6C+, CD11c-.

Die NK-, T- und ILC1-Zellen wurden mittels folgender „Gating“ Strategie definiert (Abbildung 7).

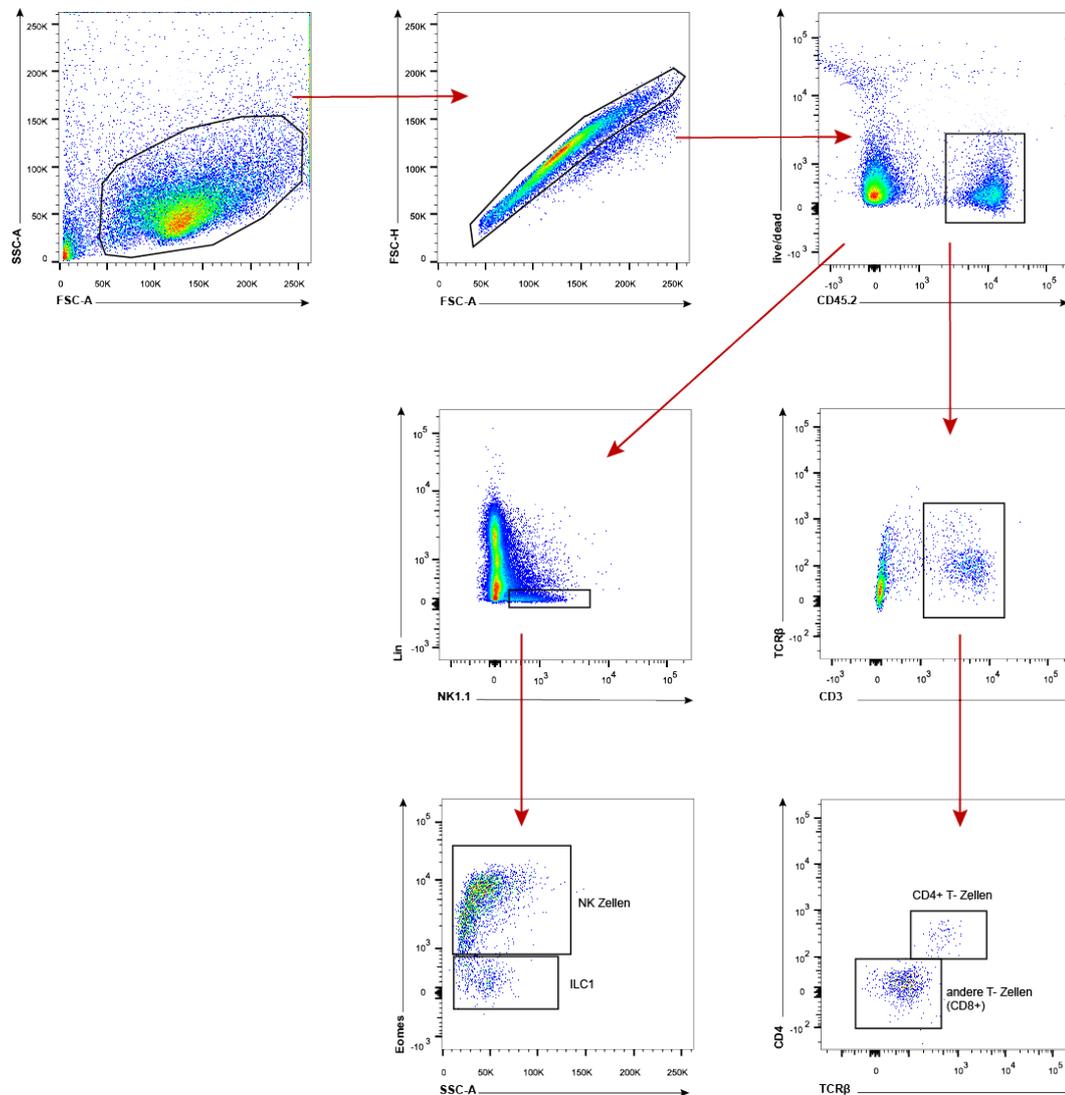


Abbildung 7: Identifizierung der NK-, ILC1- und T-Zellen aus dem murinen Genitaltrakt

Wie unter Punkt III 2.10 beschrieben, wurde der Genitaltrakt enzymatisch verdaut und die NK-, T- und ILC1-Zellen isoliert, welche mittels Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer dargestellt wurden. NK-Zellen wurden definiert, als CD45+, Lin (CD3, CD5, CD19, TCR β , TCR $\gamma\delta$, F4/80, Fc ϵ R1 α , Ly6G) -, NK1.1+, Eomes+; ILC-1 Zellen wurden definiert als CD45+, Lin-, NK1.1+, Eomes-; CD4+ Zellen wurden definiert als CD45+, CD3+, TCR β +, CD4+; CD8+ Zellen wurden definiert als CD45+, CD3+, TCR β +, CD4-.

2.11.5. Aktive Caspase-3-Färbung der HeLa-Zellen

Die fixierten Zellen (III 2.1.4) wurden von dem Eppendorf-Röhrchen in eine 96-V-Spitzbodenplatte überführt und anschließend wurde das Zellpellet in 200 μ L PBS+ 0,5 % BSA resuspendiert und bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Dieses Prozedere wurde erneut mit 200 μ L Permeabilisierungswaschpuffer (PBS+ 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin) zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (*cleaved*-Caspase-3 1:800 in 50 μ L PBS+ 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin) bei Dunkelheit und RT für 45 min inkubiert. Erneut wurden die Zellen mit PBS + 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin zweimal gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Rabbit IgG (G+L) AlexaFluor 647 1:250 in 50 μ L PBS+ 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin) für 20 min bei Dunkelheit und RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS + 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin gewaschen. Als letztes wurden die Zellen in PBS + 0,5 % BSA gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 200 μ L PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Nun wurden die Proben am Durchflusszytometer FACS Calibur gemessen. Bei der FACS-Messung korrelierte die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zelle (FSC = *Forward Scatter*), der Granularität (SSC = *Side Scatter*). Anhand der verwendeten Fluoreszenzmarker konnten die zu messenden Zellen identifiziert und anschließend mit der FlowJo Software ausgewertet werden. Folgende „*Gating*“ Strategie wurde für die Definition der aktiven Caspase-3-Zellen verwendet (Abbildung 8).

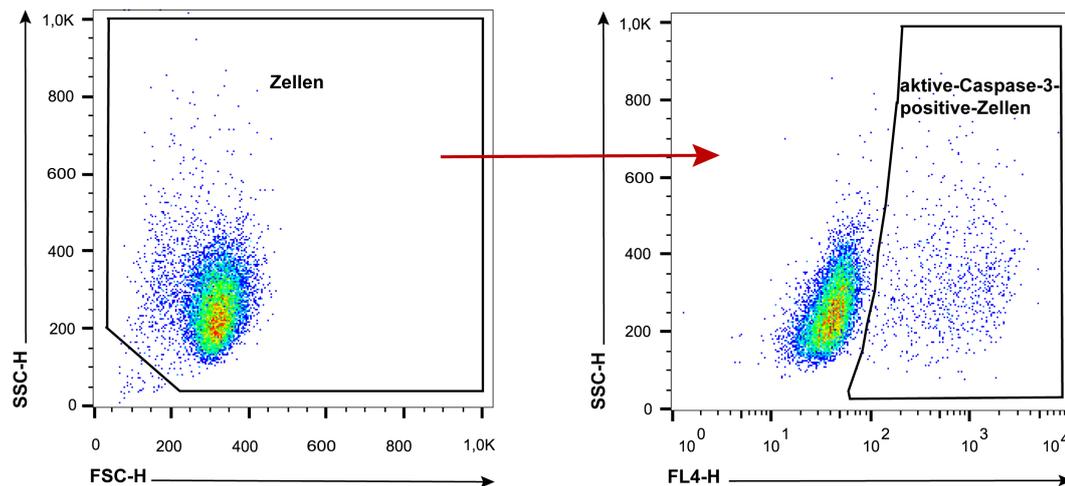


Abbildung 8: Definierung der aktiven Caspase-3-positiven Zellen

Nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren wurde nach Zugabe des gegen Caspase-3 gerichteten Antikörper, im Durchflusszytometer die positiven und negativen aktiven Caspase-3-Zellen definiert.

2.12. Statistische Datenauswertung

Die Graphen und die statistische Auswertung wurde mit GraphPad PRISM dargestellt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Anzahl der Versuche wurde mit $n = x$ angegeben. Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurde als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) berechnet. Für die Berechnung der Signifikanzen der Chemokinexpression nach der RT-qPCR wurde der ungepaarte t-Test verwendet, da die Daten logarithmisch erzeugt wurden. Für die weitere Statistikberechnung zwischen unterschiedlichen Gruppen wurde die „Two-way ANOVA“ (Zwei-Wege-Varianzanalyse) verwendet. Die anschließend ermittelte Signifikanz wurde wie folgt angegeben: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

IV. ERGEBNISSE

1.1. Auswirkung des Apoptosesignalwegs auf die Zytokinsekretion

Wie bereits unter II.1.3 beschrieben, spielen die anti-apoptotischen Proteine (Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-2 und Bcl-w) eine entscheidende Rolle im Rahmen des subletalen Apoptosesignalwegs. Die letale Aktivierung von Caspasen resultiert nicht in die Sekretion von Zytokinen, da diese die Aktivierung hemmen (6, 7, 9). Allerdings konnte im Rahmen der subletalen Aktivierung des Apoptosesignalwegs eine nachfolgende Sekretion von Zytokinen durch Epithelzellen beobachtet werden, die zur Aktivierung des Immunsystems führte (8).

Für die nachfolgenden Experimente wurden HeLa-Zellen *in vitro* mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Substanzen, beispielsweise BH3-Mimetika, behandelt. Diese BH3-Mimetika imitieren die Wirkungsweise der BH3-only-Proteine, indem sie sich an die Bindestelle der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine anlagern, wo ansonsten die BH3-only-Proteine binden würden. Somit ist eine endogene Interaktion verhindert (s.o.). Zum einen wurden die Zellen mit dem spezifisch gegen Mcl-1 gerichteten Inhibitor S6345, sowie mit dem Bcl-2-, Bcl-w- und Bcl-X_L-Inhibitor ABT-737 behandelt. Eine zentrale Fragestellung ist zum einen, ob eine Zytokinsekretion im Rahmen des subletalen Apoptosesignalwegs stattfindet und ob Unterschiede zwischen den einzelnen anti-apoptotischen Inhibitoren und Proteinen erkennbar sind. Daher war es entscheidend, eine subletale Dosis der jeweiligen BH3-Mimetika zu verwenden. Die subletale Dosis von ABT-737 war bereits aus Veröffentlichungen bzw. Vorarbeiten bekannt (65, 69). Der Mcl-1-Inhibitor wurde in Vorarbeiten von 0,03 µM bis 0,5 µM titriert, um eine Dosis zu finden, die sowohl eine verminderte Caspasenaktivierung als auch ein robustes Signal und somit eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet. Für die Titrationsschritte wurden Verdünnungsreihen auf die entsprechenden Endkonzentrationen hergestellt. Dem ergänzend wurde für die Blockade aller Caspasen der pan-Caspasen-Inhibitor Q-VD-OPh verwendet. Als Nachweis des erfolgten Zelltods diente eine gegen Caspase-3 (Apoptose-Marker) gerichtete immunologische Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Dieser Nachweis der subletalen Apoptose wurde gewählt, da bei der limitierten Aktivierung des Apoptosesignalwegs nur ein geringer Anteil der Caspase-3

aktiviert wird. Die Behandlungsdauer der Zellen mit den BH3-Mimetika wurde auf 72 h festgelegt, da nach 48-stündiger Behandlung noch kaum Zytokinsekretion gemessen werden konnte (8). Zwischen 48- und 72-stündiger Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren wurde in Vorarbeiten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Caspase-3-Aktivierung gemessen. Diese Beobachtung war Voraussetzung für die Wahl einer 72-stündigen Behandlungsdauer.

Neben den Kontrollzellen (CTRL) wurden auch Zellen mit Defizienzen der jeweiligen anti-apoptischen Proteine verwendet. Daher wurden Mcl-1- und Bcl-X_L-defiziente sowie Bcl-X_L-überexprimierende HeLa-Zellen verwendet (305). Um zu bestätigen, dass die Proteinregulation nicht durch zytotoxische Effekte verändert wird, wurden die Zellen zusätzlich zu den definierten Konzentrationen von S63845 und ABT-737 mit Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) behandelt. Die hierbei eingesetzte DMSO-Konzentration entsprach der höchsten Konzentration, die für die Inhibitoren verwendet wurde.

In allen mit DMSO behandelten Zelllinien – bezeichnet als „unbehandelte Kontrolle“ - ist in weniger als 20 % der Zellen eine Caspase-3-Aktivierung nach 72-stündiger Inkubation messbar (Abbildung 9A). Die mit S63845 behandelten Kontroll- und Bcl-X_L-defizienten Zellen zeigen in circa 30-40 % der Zellen eine messbare Aktivierung von Caspase-3. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist die Aktivierung von Caspase-3 in den Mcl-1-defizienten Zellen signifikant reduziert. Der deutlichste Effekt ist in den Bcl-X_L überexprimierenden Zellen erkennbar, denn diese weisen sowohl nach der S63845- als auch ABT-737-Behandlung keine Caspase-3-Aktivierung auf. Somit bewirkt die Überexpression von Bcl-X_L die Blockade des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Wenn alle Caspasen mittels Q-VD-OPh blockiert wurden, zeigen alle hier verwendeten Zelllinien wie erwartet keine Zunahme der Caspase-3-Aktivierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Nach ABT-737-Behandlung ist in den Kontroll- und Mcl-1-defizienten Zellen eine vergleichbare Anzahl an Zellen mit aktivierter Caspase-3 messbar. Hingegen ist eine signifikante Erhöhung des Anteils an Zellen mit aktivierter Caspase-3 in den Bcl-X_L-defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen feststellbar. Wenn zusätzlich zu Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w auch die Caspasen blockiert wurden, ist in allen hier verwendeten Epithelzelllinien eine deutliche Reduktion des Zelltods im Vergleich zur alleinigen Gabe von ABT-737 feststellbar.

Dennoch ist in den Mcl-1-defizienten Zellen ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen messbar.

Im Weiteren sollten die Zelltoddaten in Bezug zur Zytokinsekretion gesetzt werden. Für die Messung der Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-8 und CXCL-1 wurde der Überstand der behandelten Zellen verwendet. Mittels der ELISA-Methode konnten so die Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand ermittelt werden.

Von den genannten Zytokinen wurde zuerst IL-6, ein pro-inflammatorisches Zytokin, im Rahmen der subletalen Aktivierung des Apoptoseapparats gemessen und analysiert. Wie in Abbildung 9B dargestellt, ist in allen unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Zelllinien mit Ausnahme der Mcl-1-defizienten Zellen eine verminderte IL-6-Sekretion zu messen. Im Überstand der unbehandelten Kontrolle der Mcl-1-defizienten Zellen kann bereits eine relativ hohe konstitutive IL-6-Konzentration von knapp 700 pg/mL gemessen werden. Infolge der Behandlung der Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen mit den jeweiligen BH3-Mimetika, mit oder ohne Blockierung der Caspasen, ist im Zellkulturüberstand keine nennenswerte IL-6-Konzentration ersichtlich und eine signifikant reduzierte Menge an sezerniertem IL-6 gegenüber den Kontrollzellen zu messen (Abbildung 9B, C und D). Nach S63845-Behandlung kann im Zellkulturüberstand der Kontrollzellen eine IL-6-Konzentration von etwa 400 pg/mL gemessen werden. Bcl-X_L-defiziente Zellen sezernieren signifikant weniger IL-6 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Demgegenüber ist in den Mcl-1-defizienten Zellen kein Unterschied der IL-6-Sekretion im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle beobachtbar. Dennoch ist im Zellkulturüberstand der Mcl-1-defizienten Zellen eine signifikant höhere Menge an IL-6 im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar. Nach zusätzlicher Blockade der Caspasen mittels Q-VD-OPh zusätzlich der Mcl-1-Inhibition ist in den Kontrollzellen keine Reduktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur alleinigen Mcl-1-Inhibition messbar. Dies weist daraufhin, dass keine Korrelation zwischen der subletalen Aktivierung der Effektorcaspase-3 und der IL-6-Sekretion besteht. In den Bcl-X_L und Mcl-1-defizienten Zellen ist sogar ein deutlicher Anstieg der IL-6-Sekretion gegenüber der alleinigen S63845-Behandlung messbar.

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Inhibition von Mcl-1 sind bei der Inhibition von Bcl-2, Bcl-w und Bcl-X_L zu beobachten. Im Überstand der Kontrollzellen ist eine IL-6-Konzentration von knapp 500 pg/mL nach ABT-737-Behandlung messbar.

In den Bcl-X_L-defizienten Zellen kann erneut eine signifikante Reduktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Kontrollzelle verzeichnet werden, allerdings weniger ausgeprägt (120 pg/mL) als nach der Behandlung mit S63845. Weiterhin ist in den Mcl-1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit ABT-737 erneut keine IL-6-Sekretion gegenüber der unbehandelten Kontrolle messbar. Das Fehlen von entweder Mcl-1 oder Bcl-X_L resultiert zwar in unterschiedlich gemessene Zytokinkonzentrationen, dennoch ist in beiden Zelllinien nach zusätzlicher Blockade der Caspasen eine erhöhte IL-6-Sekretion messbar.

Als nächstes wurde die IL-8-Sekretion in den oben genannten Zelllinien analysiert. Nach der Behandlung mit S63845 ist in den Kontrollzellen eine IL-8-Konzentration von knapp 320 pg/mL im Überstand messbar, ähnlich wie bei der IL-6-Sekretion (Abbildung 9C). Im Gegensatz dazu ist in den anderen drei Epithelzelllinien entweder keine IL-8-Sekretion oder nur ein minimaler Anstieg im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Die zusätzliche Gabe von Q-VD-OPh (+ S63845) resultiert in allen vier Epithelzelllinien in eine Reduktion der IL-8-Sekretion im Vergleich zur alleinigen Inhibition von Mcl-1. Dabei ist anzumerken, dass die deutlichste Reduktion der IL-8-Sekretion in den Kontrollzellen zu beobachten ist. Infolge der ABT-737-Behandlung ist in dem Zellkulturüberstand der Kontrollzellen eine IL-8-Konzentration von knapp 100 pg/mL zu messen. Diese Menge an sezerniertem IL-8 in den Kontrollzellen weist keinen signifikanten Unterschied gegenüber den anderen drei Zelllinien auf. Lediglich in den Kontrollzellen ist nach ABT-737 + Q-VD-OPh-Behandlung eine Reduktion der IL-8-Sekretion im Vergleich zur alleinigen ABT-737-Behandlung zu beobachten, während in den anderen drei Zelllinien nach zusätzlicher Caspasenblockade keine Reduktion der Menge an sezerniertem IL-8 messbar ist.

Abbildung 9D zeigt die CXCL-1-Sekretionsdaten, die eine deutliche Redundanz zu der bereits beschriebenen IL-8-Sekretion (Abbildung 9C) aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zytokinsekretion von IL-6 und IL-8/CXCL-1 möglicherweise über unterschiedliche Signalwege erfolgt. Es ist vermutlich keine klare Rolle für die Caspasen bei der IL-6-Sekretion erkennbar, da keine Korrelation zu den Zelltoddaten besteht. Weder die beiden Zelllinien mit Bcl-2-Proteindefizienzen noch die Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen zeigen eine nennenswerte Induktion der IL-8 und CXCL1-Sekretion nach der Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren auf.

Dennoch lassen sich die Beobachtungen bezüglich der IL-8 und CXCL-1-Sekretion nach S63845-Behandlung in Zusammenhang zu den Zelltoddaten setzen. Somit deutet vieles darauf hin, dass die Caspasen eine entscheidende Rolle spielen. Es ist außerdem zu beachten, dass es deutliche Unterschiede bezüglich der Zytokinsekretion zwischen den beiden Inhibitoren (S63845 *versus* ABT-737) gibt.

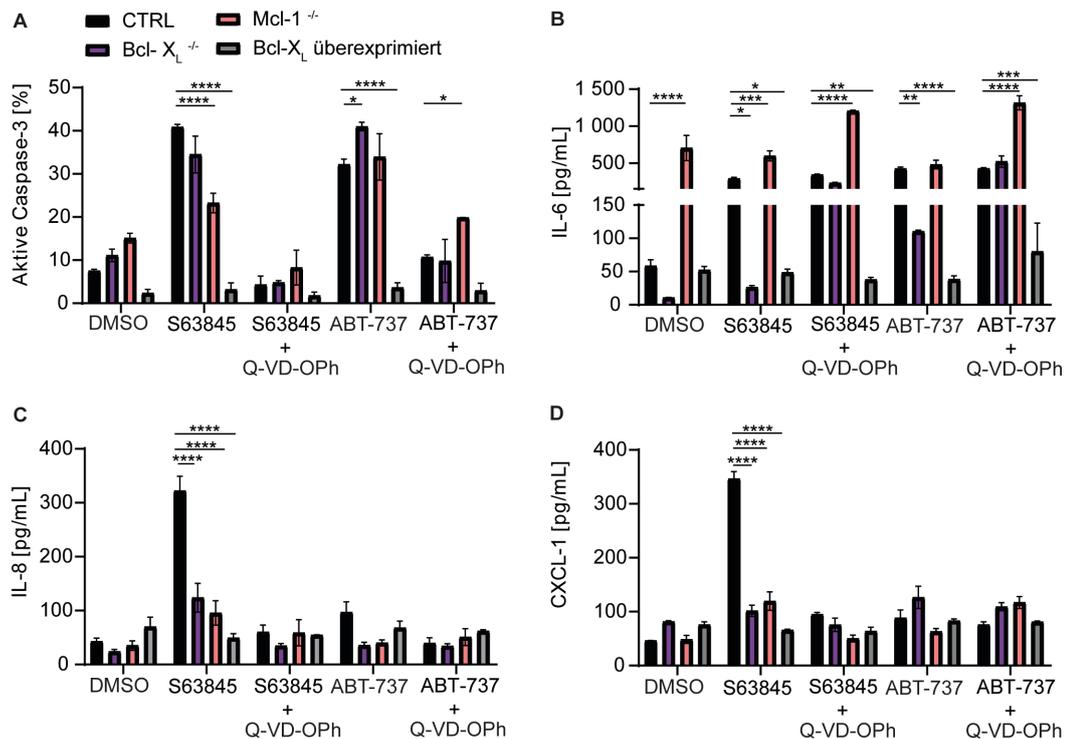


Abbildung 9: Auswirkung des Apoptosesignalwegs auf die Zytokinsekretion

CTRL, Bcl-X_L^{-/-} sowie Mcl-1-defiziente und Bcl-X_L überexprimierende HeLa-Zellen wurden für 72 h mit den in der Abbildung dargestellten Inhibitoren behandelt (Konzentrationen: 0,25 µM S63845; 10 µM ABT-737; 10 µM Q-VD-OPh). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Zellen wurden auf Apoptose untersucht, und die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf das Vorhandensein von Zytokinen analysiert. (A) Zellen, die aktive Caspase-3 als Maß für Apoptose exprimieren, wurden durch Färbung mit einem für die gespaltene Form von Caspase-3 spezifischen Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie nachgewiesen. (B-D) Die Zytokinkonzentrationen von IL-6 (B), IL-8 (C) und CXCL-1 (D) wurden nach Behandlung mit DMSO oder Inhibitoren mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels Zwei-Wege-Varianz (Two-way-ANOVA) überprüft (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

1.2. Rolle der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak in der Regulation der Zytokinsekretion nach Aktivierung des subletalen Apoptosesignalwegs

Im Anschluss an die Untersuchung der anti-apoptotischen Proteine wurden auch die pro-apoptotischen Proteine im Hinblick auf Zelltod und Zytokinsekretion im Rahmen der subletalen Apoptose analysiert. Die Porenbildung der äußeren mitochondrialen Membran infolge der Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak ist von entscheidender Bedeutung für die nachfolgende Aktivierung der Caspasen und CAD, sowie der Zytokinsekretion (306). Infolge von MOMP kann beispielsweise ins Zytosol freigesetzte mitochondriale DNA (mtDNA), sowie CAD-vermittelt freigesetzte zytosolische DNA (307) von dem DNA-Sensor der zyklischen GMP-AMP-Synthase (cGAS) detektiert werden. Mittels des Botenstoffs zyklisches Guanosin-Mono-Phosphat-Adenosin-Monophosphat (cGAMP) kann die Aktivierung des *stimulator of interferon genes* (Sting) in die Interferon-Stimulierung resultieren (309). Insbesondere die Frage, ob Bax und Bak hier gleichwertig sind oder unterschiedliche Funktionen haben, ist ungeklärt.

Für die nun folgenden Experimente wurden HeLa-Zellen verwendet, die einzeln- oder doppelt-defizient für Bax und Bak sind. Eine zentrale Fragestellung ist, ob Unterschiede zwischen Bax und Bak bezüglich des Zelltods und der Zytokinsekretion erkennbar sind und ob eine limitierte Caspase-3-Aktivierung in eine verminderten Zytokinsekretion resultiert. Diese Frage ergibt sich daraus, dass, obwohl zwischen Bax und Bak oft eine funktionelle Redundanz besteht, auch Unterschiede beschrieben wurden. Sie weisen beispielsweise in ihrem inaktiven Zustand unterschiedliche „*Steady-state*“-Zellverteilungen auf. Des Weiteren unterscheiden sie sich in ihren Präferenzen für BH3-only-Protein- und anti-apoptotischen Bindungspartnern (311). In den folgenden Experimenten wurde der apoptotische Zelltod (Caspase-3-Aktivierung) sowie die Zytokinsekretion nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren ABT-737 bzw. S63845, mit oder ohne Zugabe der pan-Caspasen-Inhibitoren (Q-VD-OPh oder Z-VAD-FMK) ermittelt.

Abbildung 10A zeigt den prozentualen Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3, der nach einer immunologischen Färbung mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurde. In der unbehandelten Kontrolle (DMSO) ist in allen vier verwendeten Epithelzelllinien keine Aktivierung der Caspase-3 nachweisbar.

Nach S63845-Behandlung der einzeln- und doppelt-defizienten-Zellen sind signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der Aktivierung von Caspase-3 festzustellen. Während etwa 40 % der Zellen in den Kontrollzellen eine Aktivierung der Caspase-3 aufweisen, ist dieser Anteil in den Bak-defizienten Zellen zwar nur leicht, aber trotzdem signifikant reduziert (ca. 30 %). Im Gegensatz dazu ist in den Bax-defizienten und Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nahezu keine Caspase-3-Aktivierung messbar. Ähnliche Ergebnisse sind bei den mit ABT-737 behandelten Zellen beobachtbar. Hier ist eine Caspase-3-Aktivierung lediglich in den Bak-defizienten Zellen und den Kontrollzellen messbar. Demgegenüber ist in den Bax-defizienten und Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen kein ABT-737-induzierter Zelltod nachweisbar. Sowohl nach Inhibition von Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w als auch nach Mcl-1-Inhibition scheint Bax in HeLa-Zellen das entscheidende pro-apoptotische Effektorprotein im mitochondrialen Apoptosesignalweg zu sein.

Abbildung 10B zeigt, dass die IL-6-Sekretion nach Behandlung mit BH3-Mimetika in Zellen mit Defizienz beider pro-apoptotischer Proteine (Bax und Bak) ausbleibt. Somit führt das Fehlen beider pro-apoptotischer Proteine nach subletalen Apoptose-Stimuli zu keiner Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob ähnliche Ergebnisse bezüglich der IL-6-Sekretion bei der Defizienz von lediglich einem der beiden pro-apoptotischen Proteine beobachtbar sind. Abbildung 10C zeigt die IL-6-Sekretion der Kontroll-, Bak- und Bax-defizienten Zellen. Zwischen den einzel-defizienten-Zelllinien Bax und Bak ist nach S68345-Behandlung (mit und ohne pan-Caspasen-Inhibitor) kein signifikanter Unterschied bezüglich der im Zellkulturüberstand gemessenen IL-6-Konzentration detektierbar. Allerdings ist die IL-6-Sekretion der beiden einzel-defizienten-Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Um den Caspase-unabhängigen Zelltod (Nekroptose) und RIPK1 zu blockieren (87), wurden die Zellen zusätzlich zum Mcl-1-Inhibitor mit Necrostatin behandelt. Wie die bisherigen Beobachtungen zeigen, gibt es keinen Unterschied zwischen den Bax- und Bak-defizienten Zellen bezüglich der IL-6-Sekretion. Im Überstand der Kontrollzellen hingegen ist eine fast 3-fach reduzierte Menge an sezerniertem IL-6 im Vergleich zur alleinigen Inhibition von Mcl-1 zu messen.

Die mit ABT-737 behandelten Bak-defizienten Zellen zeigen einen ähnlichen Trend bezüglich der IL-6-Sekretion wie die Kontrollzellen. Demgegenüber kann im Zellkulturüberstand der Bax-defizienten Zellen eine signifikant höhere Menge

an IL-6 im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bezüglich der sezernierten Menge an IL-6 im Überstand der Bax-defizienten Zellen ist auch nach zusätzlicher Inhibition der Caspasen zu beobachten. Wenn zusätzlich zu der ABT-737-Behandlung RIPK1 blockiert wurde, ist in den Kontrollzellen eine erhöhte IL-6-Sekretion im Vergleich zur alleinigen ABT-737-Behandlung messbar (knapp 600 pg/mL). Diese Induktion der IL-6-Sekretion ist auch in den Bak-defizienten Zellen zu erkennen, während in den Bax-defizienten Zellen nahezu kein Unterschied zwischen der alleinigen ABT-737-Behandlung und der zusätzlichen Necrostatin-Behandlung erkennbar ist.

Die Bax/Bak-doppel-Defizienz führt dazu, dass Zellen nicht in der Lage sind, sowohl IL-8 als auch CXCL-1 zu sezernieren, nachdem die anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 bzw. Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w blockiert wurden (vgl. Abbildungen 10D und F).

Die Abbildungen 10E und 10G zeigen die im Überstand gemessene Menge an IL-8 bzw. CXCL-1 nach Behandlung der Kontroll- und einzel-defizienten-Zellen mit den BH3-Mimetika. Den IL-6-Sekretionsergebnissen folgend, verhalten sich die mit S63845 behandelten Bax- sowie Bak-defizienten Zellen hinsichtlich der IL-8- und CXCL-1-Sekretion kongruent. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist eine signifikante Reduktion der sezernierten Menge an IL-8 und CXCL-1 in den Überständen der hier verwendeten beiden einzel-defizienten-Zellen zu erkennen. Nach zusätzlicher Blockade aller Caspasen (+ S68345-Behandlung) ist im Überstand der Kontrollzellen eine deutliche Reduktion der IL-8- und CXCL-1-Konzentration gegenüber der alleinigen S63845-Behandlung erkennbar, während in den beiden einzel-defizienten Zellen lediglich eine minimale Reduktion festgestellt wird. Nach zusätzlicher Necrostatin-Behandlung ist sowohl in den Kontroll- als auch den Bak-defizienten Zellen weder eine Induktion noch eine Reduktion der IL-8- und CXCL-1-Sekretion im Vergleich zur alleinigen S63845-Behandlung feststellbar. Demgegenüber ist im Überstand der Bax-defizienten Zellen eine höhere Menge an IL-8- und CXCL-1 beobachtbar im Vergleich zur alleinigen Mcl-1-Inhibition. Nach ABT-737-Behandlung kann im Überstand der Bax-defizienten Zellen eine signifikant höhere Konzentration von IL-8 und CXCL-1 gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen werden (knapp 410 pg/mL bzw. 320 pg/mL).

In allen drei Zelllinien ist nach Behandlung mit ABT-737 und entweder Q-VD-OPh oder Necrostatin keine nennenswerte Induktion der IL-8- bzw. CXCL-1-Sekretion zu erkennen. Dennoch ist anzumerken, dass lediglich in den Bax-defizienten Zellen eine Reduktion der IL-8- und CXCL-1-Sekretion nach zusätzlicher Blockade der Caspasen oder RIPK1 gegenüber der alleinigen ABT-737-Behandlung zu beobachten ist.

Abschließend lässt sich feststellen, dass das Fehlen von Bax zu einer deutlich verminderten Caspase-3-Aktivierung nach subletalen Apoptose-Stimuli führt und somit derselbe Schutz vor dem Zelltod, wie in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen zu beobachten ist. Es besteht nach Mcl-1-Inhibition keine Korrelation zwischen den Zelltoddaten und der IL-6-Sekretion, da entgegen den Zelltoddaten keine Sekretions-Unterschiede zwischen den Bax- sowie Bak-defizienten Zellen feststellbar sind. Bak scheint jedoch eine wichtige Rolle bei der Zytokinsekretion nach ABT-737-Behandlung zu spielen. Es ist anzunehmen, dass die IL-8- und CXCL-1-Sekretion caspasenabhängig erfolgt.

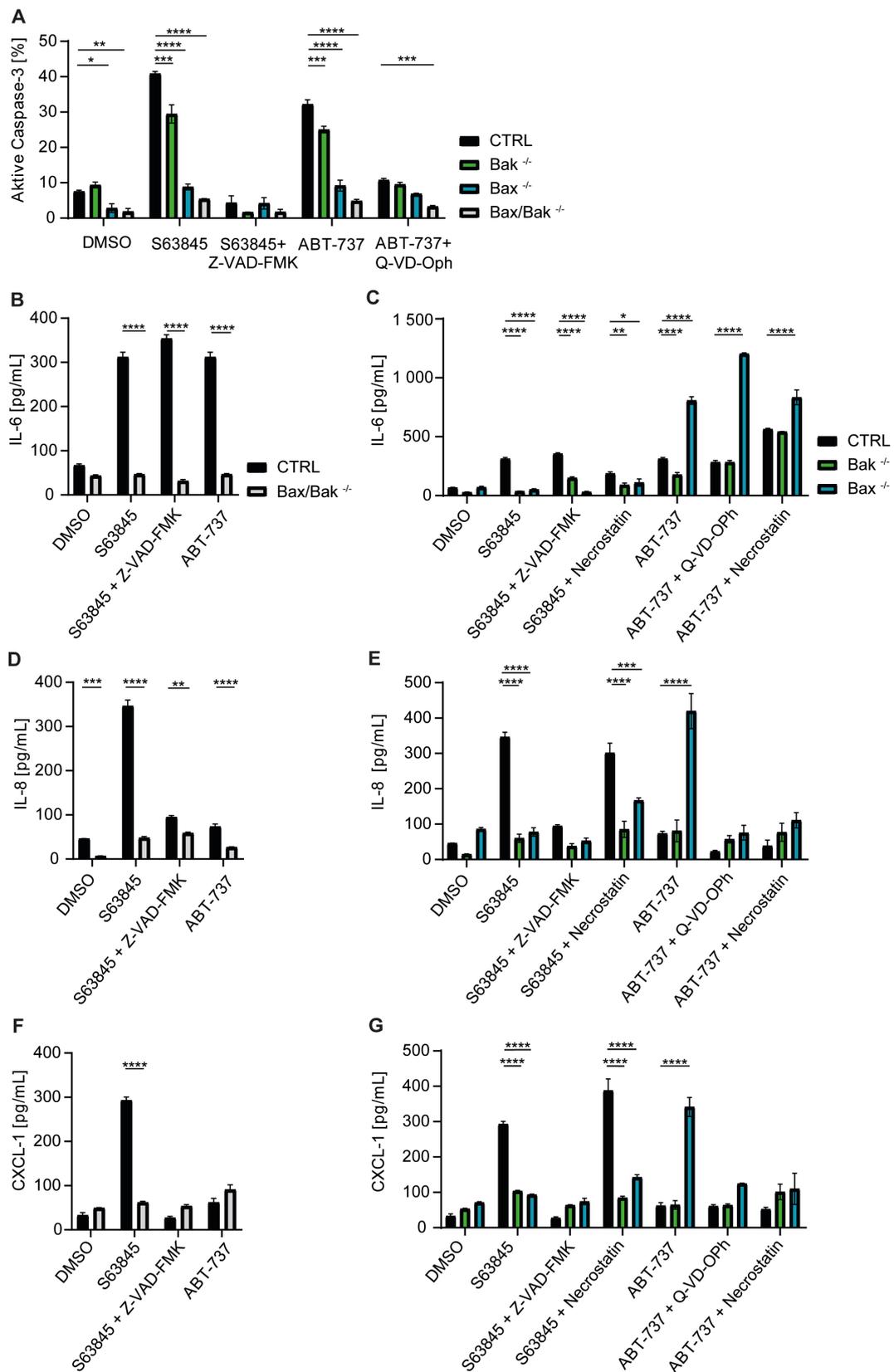


Abbildung 10: Bax/Bak-abhängige Caspasenaktivierung und Zytokinsekretion

HeLa-Zelllinien mit intaktem (CTRL) oder defizientem (Bax, Bak oder Bax/Bak-doppeltdefizient) mitochondrialem Apoptoseapparat wurden mit den in der Abbildung dargestellten Inhibitoren für 72 h behandelt (Konzentration: 0,25 μM S63845 oder 10 μM ABT-737 oder 20 μM Z-VAD-FMK oder 10 μM Q-VD-Oph oder 1 μM Necrostatin). Die Zellen wurden auf Apoptose untersucht, und die Überstände wurden mittels ELISA auf

Zytokine analysiert (A) Zellen, die aktive Caspase-3 als Maß für Apoptose exprimieren, wurden durch immunologische Färbung mit einem für die gespaltene Form von Caspase-3 spezifischen Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie nachgewiesen. (B, D, F) CTRL und Bax/Bak-doppelt-defiziente HeLa-Zellen wurden mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 oder 10 μ M ABT-737 oder 20 μ M Z-VAD-FMK behandelt. IL-6 (B), IL-8 (D), CXCL-1 (F). (C, E, G) CTRL und Bax- sowie Bak-defiziente HeLa-Zellen wurden mit DMSO oder 0,25 mM S63845 oder 10 mM ABT-737-6 oder 10 μ M Q-VD-OPh oder 1 μ M Necrostatin behandelt. (C) IL-6, (E) IL-8, (G) CXCL-1. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels Zwei-Wege-Varianz (*Two-way*-ANOVA) überprüft (* p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; **** p< 0,0001).

1.3. Kinetik der Zytokinsekretion unter Berücksichtigung einzelner proapoptotischer Proteine

In Abbildung 10 wurde bereits deutlich, dass ein signifikanter Unterschied in der Zytokinsekretion zwischen den mit ABT-737 behandelten Bax- und Bak-defizienten Zellen messbar ist. Um festzustellen, ob sich auch im zeitlichen Verlauf Unterschiede in der Zytokinsekretion der einzelnen Zelllinien ergeben, wurden zusätzliche Analysezeitpunkte (24, 48 oder 54 h) gewählt.

Abbildung 11A zeigt, dass die mit S63845 behandelten Kontrollzellen nach 48 h eine minimale IL-6-Sekretion aufweisen. Dem ergänzend sezernieren die Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen eine den Kontrollzellen vergleichbare Menge an IL-6. In den Bax-defizienten Zellen ist ebenfalls nach einer Behandlungsdauer von bis zu 54 h keine nennenswerte IL-6-Sekretion erkennbar. Besonders zu betonen ist, dass im Überstand der Kontrollzellen nach 54-stündiger Behandlung eine 12-fach reduzierte IL-6-Konzentration verglichen mit der 72-stündigen Behandlung zu messen ist. Wenn zusätzlich zu Mcl-1 auch die Caspasen blockiert werden, ist im Überstand der Kontrollzellen sowohl nach 48- als auch nach 54-stündiger Behandlung eine um die Hälfte reduzierte IL-6-Konzentration als nach 72-stündiger Behandlung messbar. Demgegenüber ist sowohl in den einzel- als auch doppelt-defizienten Zellen zwischen 54- und 72-stündiger Behandlung keine substanzielle Erhöhung der IL-6-Sekretion erkennbar. Dem ergänzend ist somit die im Überstand der einzel- und doppelt-defizienten Zellen gemessene IL-6-Konzentration nach 48- und 54-stündiger Behandlung gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert.

Nach ABT-737-Behandlung sind in den Kontrollzellen ähnliche Ergebnisse wie nach S63845-Behandlung zu beobachten. Dementgegen ist nach 48- und 54-

stündiger Behandlung im Überstand der Bax-defizienten Zellen die IL-6-Konzentration gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert. Auffallend ist, dass selbst nach 54-stündiger Behandlung in den Bax-defizienten Zellen keine nennenswerte IL-6-Sekretion erkennbar ist. Somit ist die im Überstand der Bax-defizienten Zellen gemessene IL-6-Konzentration nach 72-stündiger Behandlung um das knapp 38-fache höher als nach 54-stündiger Behandlung. Außerdem ist nach allen drei Analysezeitpunkten im Überstand der Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen eine gegenüber der Kontrollzellen signifikant höhere Menge an IL-6 detektierbar. Erneut ist in den doppelt-defizienten Zellen zwischen 54- und 72-stündiger Behandlung keine nennenswerte Erhöhung der IL-6-Sekretion messbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Induktion der IL-6-Sekretion in den Kontroll- und Bax-defizienten Zellen hauptsächlich zwischen 54- und 72-stündiger BH3-Mimetika-Behandlung erfolgt, während die IL-6-Sekretion in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen bereits nach früheren Zeitpunkten (54 h) stagniert.

Die Ergebnisse zur IL-8- und CXCL1-Sekretion nach S63845-Behandlung (+/- pan-Caspasen-Inhibitor) weisen lediglich bezüglich der tatsächlich stattfindenden, zeitlichen Induktion der Zytokinsekretion Ähnlichkeiten zu den IL-6-Sekretionsdaten auf (Abbildung 11B und C). Allerdings ist diesmal sowohl nach 24-, 48- als auch 54-stündiger S63845-Behandlung die im Überstand gemessene IL-8-Konzentration in den einzel- und doppelt-defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert. Nach S63845 + Q-VD-OPh-Behandlung ist zwischen den Kontrollzellen und den einzel- bzw. doppelt-defizienten Zellen kein signifikanter Unterschied bezüglich der IL-8-Sekretion messbar. Diese Beobachtung gilt für alle drei Analysezeitpunkte. Im Überstand der Bax-defizienten Zellen kann sowohl nach S63845- als auch nach ABT-737-Behandlung kein erheblicher Unterschied bezüglich der sezernierten IL-8 Menge zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Diese gemessenen Zytokinkonzentrationen der Bax-defizienten Zellen stehen im Kontrast zur deutlich erhöhten Zytokinsekretion nach 72-stündigem Analysezeitpunkt. Weiter ist anzumerken, dass im Überstand der Kontrollzellen zwischen 54- und 72-stündiger ABT-737-Behandlung nur circa eine Verdopplung der Zytokinkonzentration erkennbar ist. Konsekutiv zu den IL-6-Sekretionsdaten ist in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen eine Stagnation der IL-8-Sekretion nach 54-stündiger Behandlung zu verzeichnen.

Die CXCL-1 Sekretionsdaten sind in großen Teilen vergleichbar der IL-8-Sekretion (Abbildung 11C).

Es ist erkennbar, dass die pro-apoptotischen Proteine in unterschiedlichem Maße die Induktion der Zytokinsekretion beeinflussen. Dies geschieht stets in verschiedenen Zeitintervallen, nachdem die anti-apoptotischen Proteine inhibiert wurden.

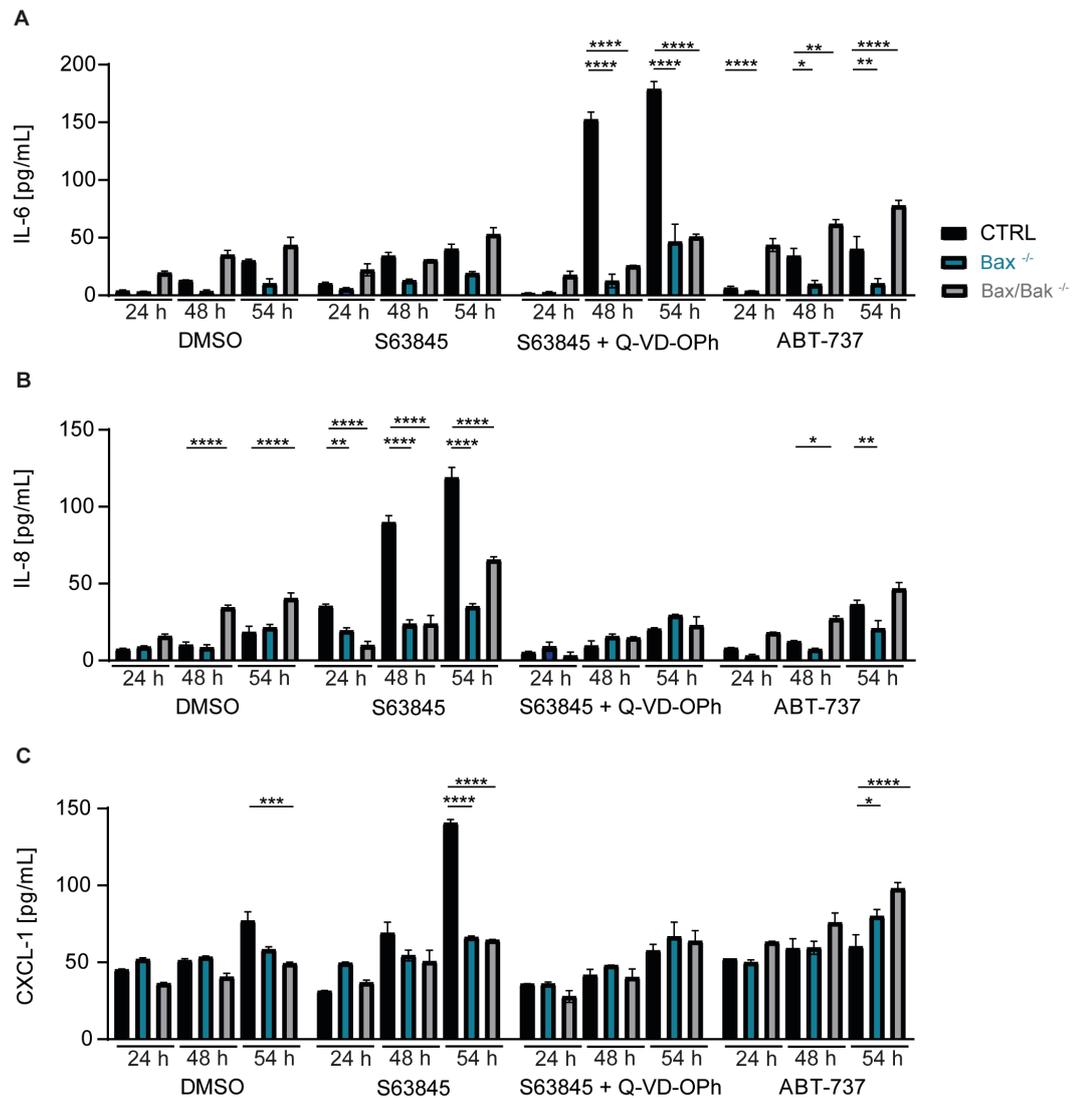


Abbildung 11: Kinetik der Zytokinsekretion

(A-C) CTRL, Bax-defiziente und Bax/Bak-doppelt-defiziente HeLa-Zellen wurden mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 (+/- 10 μ M Q-VD-OPh) oder 10 μ M ABT-737 für 24 h, 48 h und 54 h behandelt. IL-6 (A), IL-8 (B) und CXCL-1 (C) wurden im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Wege-Varianz (*Two-way-ANOVA*) überprüft (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

1.4. Beteiligung der MAP-Kinasen am subletalen Apoptosesignalweg

Zytokinsekretion ist das Ergebnis der Aktivierung diverser Signalwege. Um eine mögliche Erklärung für die IL-6-Sekretion und Aktivierungswege nachfolgend der Bax- und Bak-Aktivierung zu finden, wurde die Beteiligung von MAP-Kinasen und deren aktivierten Transkriptionsfaktoren untersucht. Es wurden bereits Interaktionen zwischen MAP-Kinasen und pro-apoptotischen Proteinen beschrieben. Publierte Untersuchungen haben gezeigt, dass phosphoryliertes p-38 und pJNK pro-apoptotische Effekte erzielen können, indem sie durch Phosphorylierung Bcl-2 und Mcl-1 hemmen (310). Darüber hinaus kann JNK die Translokation von Bax an die Mitochondrien ermöglichen (311). In den von uns durchgeführten Experimenten wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen und ergänzend dazu γ H2AX als Nachweis der DNA-Schadensantwort infolge der Caspase-abhängigen CAD-Aktivität mittels Western Blot bestimmt. Die HeLa-Zellen (CTRL, Bax- und Bak-defizient und Bax/Bak-doppelt-defizient) wurden mit den Inhibitoren ABT-737 oder S63845 für 2, 5 oder 24 h behandelt. Um die Aktivierung der MAP-Kinasen in Korrelation zu der Apoptose bzw. subletalen Apoptose zu setzen, wurde γ H2AX als indirekter Marker für entstandene DNA-Schäden verwendet (100). Nachfolgend der Aktivierung der Effektorcaspase-3 im Rahmen des subletalen Apoptosesignalwegs kann die Caspasen-aktivierte DNase (CAD) aktiviert werden und einen DNA-Schaden ermöglichen (59). Die Behandlung der Zellen mit DMSO diente als unstimulierte Lösungsmittel-Kontrolle. Die Proteinintensität wurde durch eine densitometrische Analyse unter Verwendung von ImageJ quantifiziert.

In Abbildung 12A ist zu sehen, dass lediglich nach 24-stündiger DMSO-Behandlung ein γ H2AX-Signal in den Kontroll-, Bax und Bak-defizienten Zellen detektierbar ist. Des Weiteren ist zwar ein Unterschied in der DNA-Schadensantwort zwischen den Bax- und Bak-defizienten Zellen erkennbar, allerdings ist anzumerken, dass der Unterschied sehr gering ist. Denn während in den drei eben genannten Zelllinien nur eine äußerst schwache DNA-Schadensantwort erkennbar ist, ist in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen auch nach 24 h kein γ H2AX-Signal messbar. Den Ergebnissen folgend ist in den mit S63845 oder ABT-737 behandelten Bax/Bak-doppelt defizienten Zellen ebenso kein γ H2AX-Signal zu erkennen (Abbildung 12B und C).

Dies bestätigt, dass die gemessene DNA-Schadensantwort vom mitochondrialen Apoptosesignalweg und beiden pro-apoptotischen Proteinen abhängig ist.

Bei den mit S63845 behandelten Kontroll- und Bak-defizienten Zellen liegt nach 5-stündiger Behandlung der größte DNA-Schaden in der Zelle vor und nach 24 h zeigt sich ein rückläufiger Trend bezüglich der DNA-Schadensantwort (Abbildung 12B). In den Bax-defizienten Zellen hingegen ist nach eben dieser zweistündigen Inhibitor-Behandlung das stärkste γ H2AX-Signal detektierbar, und die DNA-Schadensantwort nimmt danach kontinuierlich ab.

Nach ABT-737-Behandlung ist kein Unterschied zwischen den hier verwendeten einzel-defizienten Epithelzelllinien ersichtlich und die DNA-Schadensantwort steigt nach 2 h langsam an und erreicht nach 24 h das vorläufige Maximum an Signalintensität (Abbildung 12C). Somit weisen die beiden hier verwendeten BH3-Mimetika eine unterschiedliche Kinetik hinsichtlich ihrer Aktivität und Aktivierung des Apoptosesignalwegs auf.

Wie aus Abbildung 12D hervorgeht, ist in den unstimulierten Kontroll- und Bak-defizienten Zellen zwischen 2- und 24-stündiger DMSO-Behandlung keine pJNK-Induktion nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist in den Bax- und Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nach 24 h ein deutlich stärkeres pJNK-Signal sowohl im Vergleich zur 2-stündigen Inkubationsdauer als auch gegenüber den Kontrollzellen erkennbar. Wenn Mcl-1 inhibiert wurde, ist kein Unterschied in der pJNK-Aktivierung zwischen den Kontroll-, Bak- oder Bax-defizienten Zellen erkennbar. In allen drei Zelllinien ist nach 5-stündiger Behandlung das Maximum der Aktivierung messbar. In den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen ist jedoch keine pJNK-Induktion feststellbar und die Intensität der DNA-Schadensantwort scheint zwischen 2 h und 24 h gleich zu sein (Abbildung 12E).

Nach ABT-737-Behandlung ist in den Kontroll- und Bak-defizienten Zellen nach 24 h eine leichte pJNK-Aktivierung messbar. Im Gegensatz dazu erfolgt in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nach 24-stündiger Behandlung eine deutlich stärkere pJNK-Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 12F). Der Effekt von ABT-737 in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen ist überraschend, da alle spezifischen Effekte des Inhibitors Bax oder Bak abhängig sind. Dies spricht für eine unspezifische Aktivität von ABT-737.

Als nächstes wurde die p-p38 Aktivierung nach den pro-apoptotischen Stimuli analysiert. In den unstimulierten Kontrollzellen ist zwischen 2 und 24 h keine signifikante Veränderung in der p-p38-Aktivierung zu beobachten (Abbildung 12G). Ähnliche Trends sind auch in den beiden einzel-defizienten Zelllinien zu erkennen, wobei die Intensität des p-p38-Signals nach 2 h stetig abnimmt. In den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen hingegen ist eine gegenläufige Beobachtung zu verzeichnen, mit einer zunehmenden Intensität des p-p38-Signals zwischen 5 und 24 h. Nach S63845-Behandlung ist in den Kontroll- und Bax-defizienten Zellen nach 5-stündiger Behandlung die höchste Intensität von p-p38 detektierbar (Abbildung 12H). Ähnlich der pJNK-Aktivierung ist in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nahezu keine p-p38-Aktivierung nachweisbar. Nach ABT-737-Behandlung sind die gleichen Ergebnisse wie bereits bei der pJNK-Aktivierung zu beobachten. (Abbildung 12I).

Abschließend wurde die Aktivierung der dritten MAP-Kinase, p-ERK, genauer untersucht. Zwischen den unstimulierten Kontrollen der jeweiligen Zelllinien sind keine Unterschiede bezüglich der p-ERK-Aktivierung detektierbar und es ist keine eindeutige zeitabhängige Induktion bis 24 h zu erkennen (Abbildung 12J). Nach S63845-Behandlung ist erneut in allen Zelllinien, außer den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen, nach 5 h eine leichte p-ERK-Aktivierung messbar (Abbildung 12K). Nach 24-stündiger ABT-737-Behandlung ist erneut nur in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen eine deutliche Aktivierung dieser MAP-Kinase messbar (Abbildung 12L).

Nachfolgend der Mcl-1-Inhibition besteht zwischen allen drei MAP-Kinasen eine deutlich erkennbare Korrelation. Dem ergänzend ist, ausgenommen der Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen, eine Aktivierung der beschriebenen MAP-Kinasen detektierbar. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der drei MAP-Kinasen nach Inhibition von Mcl-1 von Bax und Bak abhängig erfolgt. Es sind keine konsistenten Unterschiede in der Aktivierung der MAP-Kinasen zwischen den beiden einzel-defizienten Zelllinien vor allem nach der ABT-737-Behandlung zu beobachten. Die Analyse der MAP-Kinasen liefert somit keine Erklärung für die deutlich erhöhte Zytokinsekretion in den Bax-defizienten Zellen.

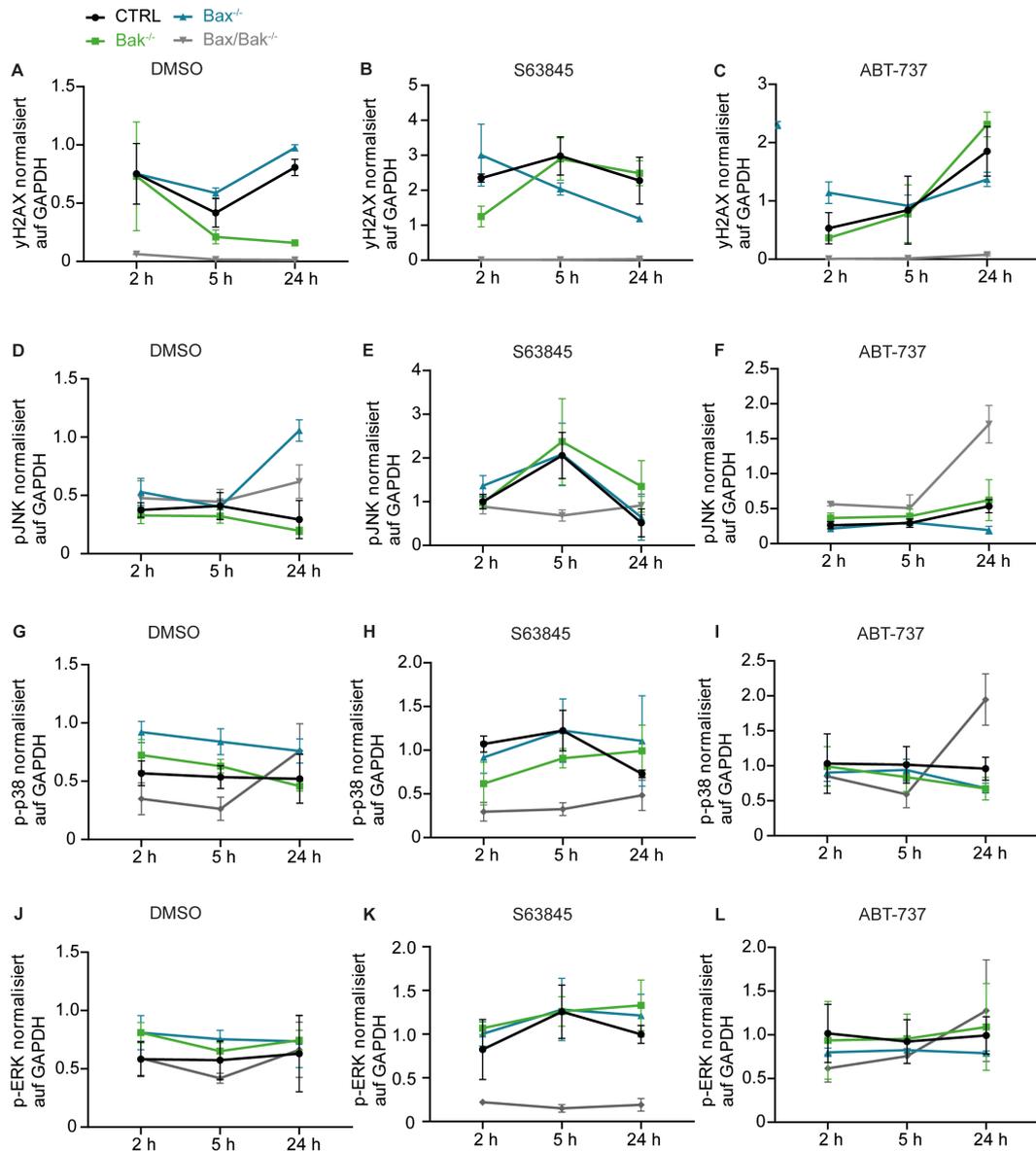


Abbildung 12: Beteiligung der MAP-Kinasen am subletalen Apoptosesignalweg

(A-L) CTRL, Bax- sowie Bak-defiziente und Bax/Bak-doppelt-defiziente HeLa-Zellen wurden mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 oder 10 μ M ABT-737 für 2 h, 5 h und 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinspiegel für γ H2AX (A-C), pJNK (D-F), p-p38 (G-I) und pERK (J-L) via Western Blot analysiert. Für die Auswertung wurde auf GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Zu beachten sind die z.T. unterschiedlichen Skalen der Ordinate.

1.5. Der NF- κ B-Signalweg spielt keine messbare Rolle für die IL-6-Sekretion

Um weiter die Frage zu klären, welche Signalkaskade an der Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IL-6, im Rahmen der subletalen Apoptose eine Rolle spielt, wurde der NF- κ B-Signalweg genauer untersucht. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt zur Expression von Zielgenen, die nachfolgend die Freisetzung von beispielsweise antimikrobiellen Molekülen und/oder Zytokinen zur Aktivierung der Immunantwort vermitteln können (105).

Für den Nachweis der NF- κ B-Aktivierung wurden NF- κ B-Reporterzellen generiert. Die Ermittlung der Aktivierung von NF- κ B erfolgt über die Co-Expression von destabilisiertem GFP (dscGFP) unter einem NF- κ B-responsiven Promoter. Am Durchflusszytometer (FACS Calibur) konnte diese Aktivierung über GFP-Fluoreszenz gemessen werden. Sowohl Kontroll- als auch Bax/Bak-doppelt-defiziente Zellen wurden verwendet und mit den Inhibitoren ABT-737, S63845 und dem pan-Caspasen-Inhibitor Z-VAD-FMK behandelt. Als Positivkontrolle diente TNF, das über TNFR1/2 sowohl MAP-Kinasen als auch NF- κ B-abhängige zelluläre Antworten aktivieren kann (312). Um die NF- κ B-Aktivierungen im Zeitverlauf zu erfassen, wurden verschiedene Analysezeitpunkte (3 h, 8 h, 18 h, 24 h oder 48 h) ausgewählt. Da ein signifikanter Unterschied in der Zytokinsekretion zwischen den Kontroll- und Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nach ABT-737- als auch S63845-Behandlung beobachtet wurden, müsste somit auch ein Unterschied in der NF- κ B-Aktivierung nachweisbar sein.

Sowohl in den Kontroll- als auch den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen wird, beginnend nach 8-stündiger TNF-Behandlung, eine Aktivierung von NF- κ B in der Positivkontrolle beobachtet. Demgegenüber wurde nach Behandlung beider BH3-Mimetika (+/- pan-Caspasen-Inhibitor) während des gesamten Zeitverlaufs (3-48 h) keine Aktivierung von NF- κ B durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 13A).

Um mögliche Unterschiede in der NF- κ B-Aktivierung zwischen den Bax- und Bak-defizienten Zellen zu erfassen, wurde ein Western Blot aus den Lysaten dieser einzel-defizienten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden nach einer Inkubationsdauer von 2, 5 oder 24 h mit den entsprechenden Inhibitoren analysiert. Der Nachweis von phospho-p65 deutet auf eine Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs hin. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die

Expressionskinetiken der einzelnen hier verwendeten Zelllinien hinsichtlich der p65-Aktivierung.

Die exemplarischen Western Blot-Auszüge (Abbildung 13B und C) veranschaulichen, dass nach 24-stündiger Behandlung mit den BH3-Mimetika keine Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen erkennbar sind. Demnach scheint dieser Signalweg nicht für die erhöhte IL-6-Sekretion in den Bax-defizienten Zellen nach ABT-737-Behandlung verantwortlich zu sein.

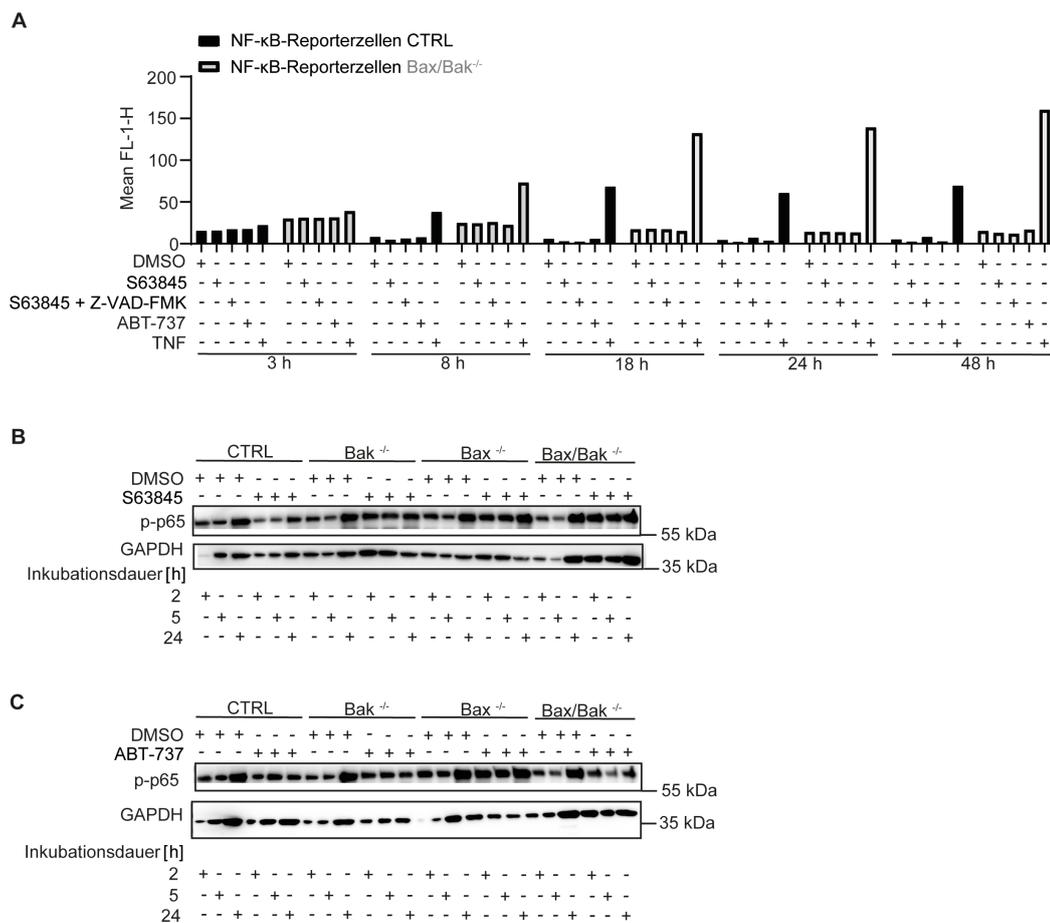


Abbildung 13: Nach subletalen Apoptosestimuli spielt der NF- κ B-Signalweg keine erkennbare Rolle in der Zytokinsekretion

Diverse Zelllinien mit intaktem (CTRL) oder defizientem (Bax, Bak oder Bax/Bak-doppelt-defizienten) mitochondrialem Apoptoseapparat wurden mit diversen Inhibitoren oder Stimuli behandelt. (A) NF- κ B-Reporterzellen CTRL oder Bax/Bak^{-/-} wurden für 3 h, 8 h, 18 h, 24 h und 48 h mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 oder 10 μ M ABT-737 oder 1 ng/ml TNF- α behandelt. Auswertung der Aktivierung von NF- κ B über Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz am Durchflusszytometer Calibur. (B) und (C) CTRL, Bax-defiziente sowie Bak-defiziente HeLa-Zellen wurden mit 0,25 mM S63845 oder 10 mM ABT-737 für 2 h, 5 h und 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und für die p-p65 Expression via Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für n=3 unabhängige Experimente.

1.6. Aktivierung von Caspase-3 und Zytokinsekretion nachfolgend der Mitochondrienaktivierung nach subletalen Apoptose-Stimuli (I)

Nachfolgend der Bcl-2-Familienproteine sollen nun weitere Proteine im intrinsischen Apoptosesignalweg bezüglich ihrer Rolle bei der Zytokinsekretion und Caspase-3-Aktivierung analysiert werden. Wie bereits unter II.1.2 erwähnt, erfolgen nach der Smac- und Cytochrom *c*-Ausschüttung aus den Mitochondrien unterschiedliche Kaskaden, die jeweils in der Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 und nachfolgend der CAD-Aktivierung resultieren (62). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Chemikalien, die die Funktion von Smac imitieren (Smac-Mimetika) zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen mittels des alternativen NF- κ B-Signalwegs führen (313, 314). Nachfolgend der Apoptose ist Smac zwar ebenfalls zytosolisch lokalisiert und könnte den NF- κ B-Signalwege aktivieren, aber die pro-inflammatorischen Signale werden durch aktivierte Caspasen unterdrückt (9). Insbesondere Smac (315) und weitere Proteine, die im direkten Zusammenhang mit Smac stehen, wurden in den hier folgenden Experimenten näher betrachtet. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Defizienzen in Smac, PARL und XIAP verwendet. Subletale pro-apoptotische-Stimuli wurden durch BH3-Mimetka (S63845 oder ABT-737) erzielt. Der Zelltod wurde mittels immunologischer Färbung der aktiven Caspase-3-positiven Zellen durch Durchflusszytometrie (Calibur) ermittelt.

Wie in Abbildung 14A erkennbar, liegt der prozentuale Anteil an Zellen mit aktivierter Caspase-3 in den unbehandelten Kontrollen der drei verwendeten Zelllinien, mit Ausnahme der XIAP-defizienten Zellen, unter 10 %. Nach S63845-Behandlung ist in den Kontroll- und XIAP-defizienten Zellen eine deutliche Caspase-3-Aktivierung messbar. Die Smac- und PARL-defizienten Zellen hingegen sind vor S63845-induziertem Zelltod weitestgehend geschützt. Nach ABT-737-Behandlung liegt der Anteil an aktiven Caspase-3-positiven Zellen in den Kontroll- und XIAP-defizienten-Zellen zwischen 30 und 40 %, während die Smac- und PARL-defizienten-Zellen erneut vor dem Zelltod geschützt sind. Somit ist erkennbar, dass eine Defizienz von entweder Smac oder PARL trotz pro-apoptotischer Stimuli in eine deutlich verminderte Caspase-3-Aktivierung resultiert.

Im nächsten Schritt sollte die limitierte Caspase-3-Aktivierung in Relation zu der Zytokinsekretion gesetzt und analysiert werden. In keiner der vier verwendeten Epithelzelllinien ist in der unbehandelten Kontrolle eine erhebliche IL-6-Sekretion zu verzeichnen (Abbildung 14B). Nach der Inhibition von Mcl-1 ist jedoch eine signifikant höhere IL-6-Konzentration im Überstand der Smac- und PARL-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektierbar. Diese Beobachtung steht im deutlichen Widerspruch zu der gemessenen Caspase-3-Aktivierung. Dementgegen konnte im Überstand der XIAP-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant weniger IL-6 nachgewiesen werden (knapp 100 pg/mL). Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach der S63845-Behandlung ist nach ABT-737-Behandlung zwischen den Kontroll- und Smac-defizienten Zellen kein Unterschied bezüglich der IL-6-Sekretion zu erkennen. Ergänzend konnte im Überstand der XIAP-defiziente Zellen signifikant mehr IL-6 im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Nach zusätzlicher Blockade aller Caspasen (S63845 + Z-VAD-FMK) ist keine Reduktion der IL-6-Sekretion in den Kontroll- und XIAP-defizienten Zellen im Vergleich zur alleinigen S63845-Behandlung messbar, während in den Smac-defizienten Zellen eine Reduktion der IL-6-Sekretion zu erkennen ist (Abbildung 14C)

Weiter wurde die IL-8-Sekretion in den hier beschriebenen vier Epithelzelllinien gemessen. Entgegen den IL-6-Sekretionsdaten ist nach S63845-Behandlung im Überstand der Smac- und PARL-defizienten Zellen signifikant weniger IL-8 im Vergleich zu den Kontrollzellen messbar (Abbildung 14D). Die im Überstand der Smac- und PARL-defizienten Zellen ermittelte IL-8-Konzentration beträgt lediglich knapp 100 pg/mL. Die hier beobachteten IL-8-Sekretionsdaten können in Relation zu der Caspase-3-Aktivierung gesetzt werden (Abbildung 14A). Im Überstand der XIAP-defizienten Zellen ist hingegen sowohl nach Behandlung mit beiden BH3-Mimetika signifikant mehr IL-8 gegenüber der Kontrollzellen messbar. Nach ABT-737-Behandlung ist im Überstand der Kontroll-, Smac- und PARL-defizienten Zellen kein IL-8-Konzentrationsunterschied detektierbar.

Nach der gleichzeitigen Gabe von S63845 und Z-VAD-FMK ist eine Reduktion der IL-8- und CXCL-1-Konzentration in allen hier verwendeten Zelllinien im Vergleich zur alleinigen S63845-Behandlung beobachtbar (Abbildung 14E und 14G).

In den bisherigen Experimenten wurde eine klare Korrelation zwischen den IL-8- und CXCL-1-Sekretionsdaten beobachtet. Hier ist nun ein deutlicher Unterschied in den XIAP-defizienten Zellen zwischen der IL-8- und CXCL-1-Sekretion messbar. Denn nach S63845-Behandlung ist im Überstand der Smac-, PARL- sowie den XIAP-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikante Reduktion der CXCL-1-Konzentration messbar (Abbildung 14F). Nach ABT-737-Behandlung ist zwischen den Kontroll- und XIAP-defizienten Zellen kein Unterschied bezüglich der CXCL-1-Sekretion erkennbar.

Sowohl bezogen auf die IL-6-, IL-8- und CXCL-1-Sekretion als auch der Caspase-3-Aktivierung verhalten sich die PARL- und Smac-defizienten Zellen ähnlich. Zusammenfassend zeigen sich in den Ergebnissen nicht nur Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien, sondern auch zwischen den eingesetzten Inhibitoren. PARL und Smac sind notwendig für die Caspasenaktivierung in der mitochondrialen Apoptose. Die Unterschiede in der Zytokinsekretion sind vermutlich dadurch erklärbar. Da Caspasen die Sekretion von IL-6 blockieren können, könnte das Fehlen dieses Effekts die Unterschiede erklären. Wie bereits in den früheren Experimenten korreliert die IL-8-Sekretion mit der Caspasenaktivierung.

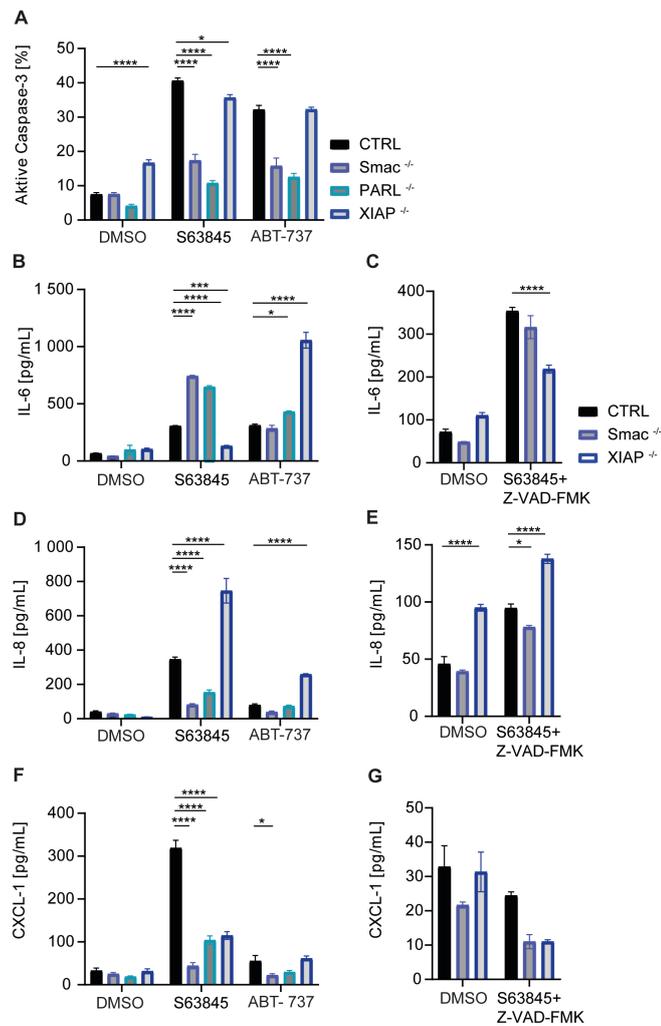


Abbildung 14: Apoptose und Zytokinsekretion in Abwesenheit anti-apoptotischer Proteine

HeLa-Zelllinien defizient in Smac, PARL, XIAP oder eine entsprechende Kontrollzelllinie (CTRL) wurden mit diversen Inhibitoren für 72 h behandelt. Die Zellen wurden auf Apoptose untersucht, und die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf Zytokinsekretion analysiert (A) Zellen, die aktive Caspase-3 als Maß für Apoptose exprimieren, wurden durch Färbung mit einem für die gespaltene Form von Caspase-3 spezifischen Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Zytokinkonzentrationen von IL-6 (B-C), IL-8 (D-E) und CXCL-1 (F-G) wurden nach der Behandlung mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 oder 10 μ M ABT-737 oder 20 μ M Z-VAD-FMK gemessen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels Zwei-Wege-Varianz (Two-way-ANOVA) überprüft (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

1.7. Aktivierung von Caspase-3 und Zytokinsekretion nachfolgend der Mitochondrienaktivierung nach subletalen Apoptose-Stimuli (II)

Im vorliegenden Kapitel wurden nun weitere Proteine untersucht, die an der Aktivierung von Caspasen beteiligt sind. Hierzu zählen Apaf-1, Caspase-9 im intrinsischen (50, 57) und Caspase-8 im extrinsischen Signalweg (vgl. Kapitel II 1.1). Für die nachfolgenden Experimente wurden Apaf-1-, Caspase-9-, Caspase-8- und CAD-defiziente HeLa-Zellen verwendet.

Um den Anteil an aktivierter Caspase-3 zu messen wurde nach 72-stündiger Behandlung mit S63845 oder ABT-737 durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Abbildung 15A). Nach S63845-Behandlung ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den CAD- sowie Caspase-8-defizienten Zellen bezüglich der Caspase-3-Aktivierung messbar. Im Gegensatz dazu sind Zellen mit fehlendem Apaf-1 vor Apoptose geschützt. Demzufolge ist in den Apaf-1-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion des Anteils an Zellen mit aktivierter Caspase-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen. Nach ABT-737-Behandlung ist eine signifikante Reduktion des Anteils an aktiven Caspase-3-positiven Zellen in den Apaf-1-, CAD- als auch Caspase-8-defizienten Zellen gegenüber Kontrollzellen zu beobachten.

Nachfolgend wurde nach 72-stündiger Behandlung mit diversen BH3-Mimetika die IL-6-Sekretion der einzelnen Zelllinien gemessen (Abbildung 15B). Nach S63845-Behandlung ist im Überstand der Apaf-1- und Caspase-9-defizienten Zellen eine signifikant höhere Menge an IL-6 gegenüber der Kontrollzellen detektierbar. Dementgegen ist nach ABT-737-Behandlung ein deutlicher Unterschied zwischen den Apaf-1- und Caspase-9-defizienten Zellen bezüglich der IL-6-Sekretion zu verzeichnen. Denn die im Überstand gemessene IL-6-Konzentration der Apaf-1-defizienten Zellen ist sowohl gegenüber Kontrollzellen als auch den Caspase-9-defizienten Zellen signifikant erhöht (1000 pg/mL). Im Gegensatz dazu ist in den CAD- und Caspase-8-defizienten Zellen sowohl nach S63845 als auch nach ABT-737-Behandlung keine IL-6-Sekretion zu messen.

In Abbildung 15C wurden die Zellen zusätzlich zum Mcl-1-Inhibitor mit dem pan-Caspasen-Inhibitor Z-VAD-FMK behandelt. In den Kontroll- und CAD-defizienten Zellen ist keine Reduktion der im Überstand gemessenen IL-6-Konzentration im Vergleich zur alleinigen S63845-Behandlung nachzuweisen. Demgegenüber ist in den Caspase-8-defizienten Zellen nach zusätzlicher Blockierung aller Caspasen ein

deutlicher Anstieg der IL-6-Sekretion messbar und die im Überstand gemessene IL-6-Konzentration ist gegenüber den Kontrollzellen signifikant erhöht.

Ergänzend zur IL-6-Sekretion wurde auch die IL-8-Sekretion ermittelt. Entgegen den IL-6-Sekretionsdaten ist nach Mcl-1-Inhibition im Überstand der Apaf-1, Caspase-9- und CAD-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion der IL-8-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen messbar (Abbildung 15D). Ebenso ist in den Caspase-8-defizienten Zellen eine der Kontrollzellen vergleichbare hohe IL-8-Sekretion detektierbar. Nach ABT-737-Behandlung ist lediglich im Überstand der Caspase-8-defizienten Zellen eine signifikant höhere IL-8 Menge gegenüber Kontrollzellen messbar (knapp 350 pg/mL). Durch die Inhibition aller Caspasen (+S63845) ist im Überstand der Kontroll-, CAD- und Caspase-8-defizienten Zellen eine deutliche Reduktion der IL-8-Konzentration gegenüber der alleinigen S63845-Behandlung messbar (Abbildung 15E). Den IL-6-Sekretionsdaten folgend, ist erneut die Menge an IL-8 im Überstand der Caspase-8-defizienten Zellen gegenüber der Kontrollzellen signifikant erhöht.

Bezüglich der CXCL-1-Sekretion sind deutliche Redundanzen zu den IL-8-Sekretionsdaten erkennbar (Abbildung 15F). In den vier defizienten Zelllinien (Apaf-1, Caspase-9-, Caspase-8- und CAD-defizienten Zellen) ist nach Mcl-1-Inhibition oder ABT-737-Behandlung eine signifikante Reduktion der CXCL-1-Sekretion gegenüber den Kontrollzellen detektierbar. Allerdings fällt auf, dass zwischen der CXCL-1- und IL-8-Sekretion Unterschiede in den Caspase-8-defizienten Zellen nach BH3-Mimetika-Behandlung messbar sind. Nach zusätzlicher Caspasen-Inhibition (S63845 + Z-VAD-FMK) kommt es zu einer klaren Reduktion der im Überstand gemessenen CXCL-1-Konzentration in den Kontroll-, CAD- und Caspase-8-defizienten Zellen im Vergleich zur alleinigen S63845-Behandlung (Abbildung 15G).

Schließlich scheint CAD möglicherweise eine Rolle in der Sekretion aller drei untersuchten Zytokine zu spielen, während Caspase-8 bei der IL-6- und CXCL-1-Sekretion von Bedeutung zu sein scheint. Darüber hinaus sind Unterschiede zwischen der Inhibition von Mcl-1 *versus* Bcl-2, Bcl-w und Bcl-X_L in Bezug auf die Sekretion diverser Zytokine zu beobachten.

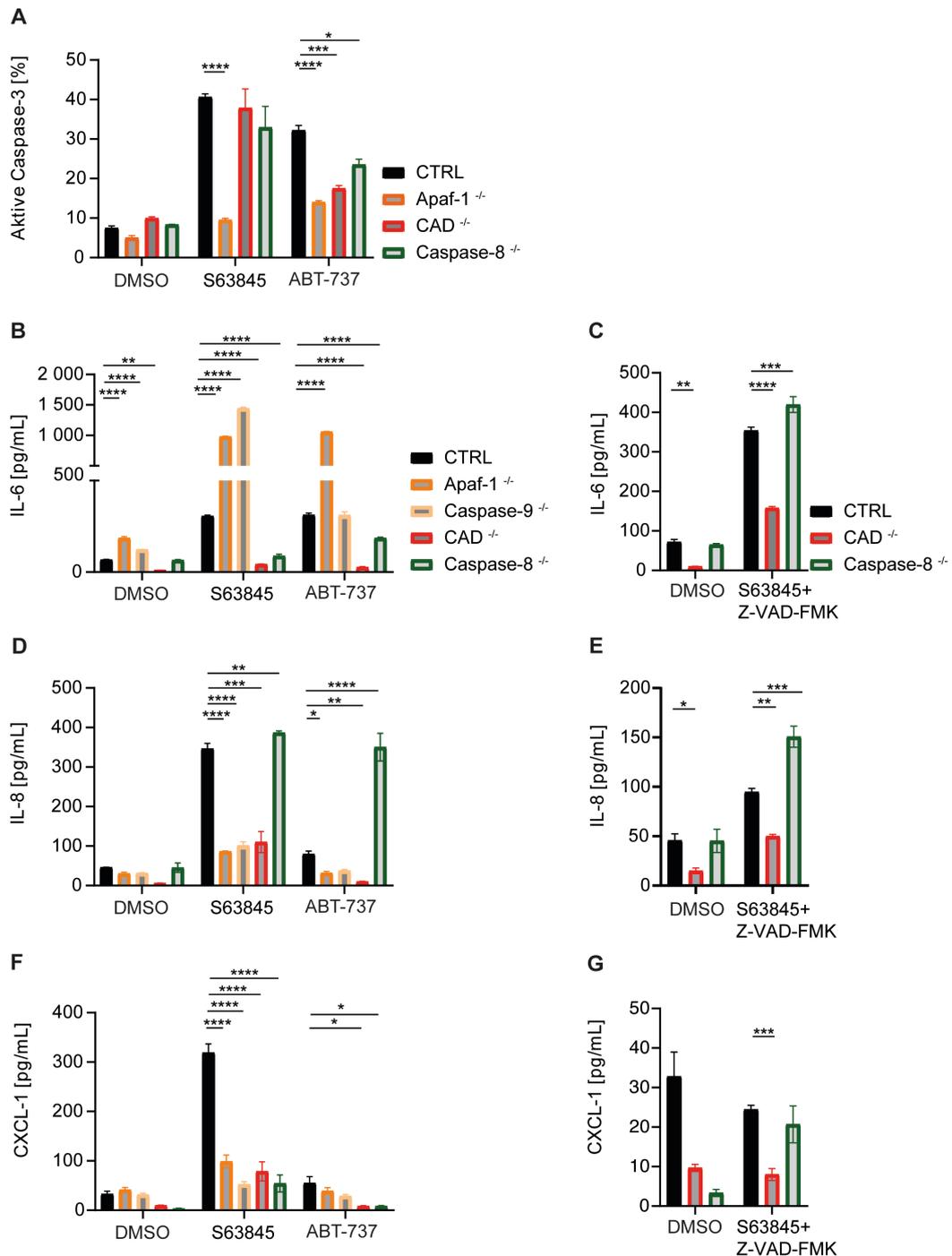


Abbildung 15: CAD-abhängige Zytokinsekretion

HeLa-Zelllinien defizient in Apaf-1, Caspase-9, CAD, Caspase-8 oder eine entsprechende Kontrollzelllinie (CTRL) wurden mit diversen Inhibitoren für 72 h behandelt. Überstände wurden mittels ELISA auf Zytokine analysiert (A) Zellen, die aktive Caspase-3 als Maß für Apoptose aufweisen, wurden durch Färbung mit einem für die gespaltene Form von Caspase-3 spezifischen Antikörper und anschließender Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Zytokinkonzentrationen von IL-6 (B-C), IL-8 (D-E) und CXCL-1 (F-G) wurden nach der Behandlung mit DMSO oder 0,25 μ M S63845 oder 10 μ M ABT-737 oder 20 μ M Z-VAD-FMK gemessen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von mindestens n=3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels Zwei-Wege-Varianz (*Two-way-ANOVA*) überprüft (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001).

1.8. Die Zytokinsekretion erfolgt im Salmonellen-Infektionsmodell unabhängig von Bax und Bak

Wie bereits gezeigt wurde, kann eine limitierte Aktivierung von Bax und Bak resultierend in *Minority MOMP*, bei begrenzter Aktivierung von Caspasen zur Zytokinsekretion führen. Meistens sind Infektionen mit Pathogenen nicht mit einer starken Ausprägung der klassischen Apoptose assoziiert, obwohl einige Pathogene ein pro-apoptotisches Potenzial aufweisen (316). Daher scheint es plausibel, dass Pathogene den Signalweg der subletalen Apoptose in infizierten Zellen aktivieren, und dieser Signalweg könnte eine immunologische Rolle bei einer Infektion spielen. Im Gegensatz zu Viren replizieren die meisten Bakterien nicht innerhalb einer Zelle, mit Ausnahme von obligat intrazellulären Bakterien wie Chlamydien oder fakultativ intrazellulären Bakterien wie Salmonellen. Anhand des Infektionsmodells mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Salmonella* Typhimurium wurde die Rolle des mitochondrialen Apoptosesignalwegs für die angeborene Immunantwort in den folgenden Experimenten analysiert. Es wurde untersucht, ob die Aktivierung des subletalen Apoptosesignalwegs infolge einer Salmonelleninfektion zu einer Zytokinsekretion durch zerstörte oder infizierte Epithelzellen führt und infolgedessen das Immunsystem aktivieren könnte (8). Um Pathogene zu eliminieren, können weitere Immunzellen durch die MOMP-assoziierte Zytokinsekretion rekrutiert werden. Zu diesem Zweck wurden Kontroll-, Smac-, PARL-, Apaf-1-, Caspase-9- und Bax/Bak-doppelt-defiziente HeLa-Zellen mit einer MOI von 50 von *Salmonella* Typhimurium für 24 h infiziert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da Brokatzky *et al.* bereits gezeigt hatten, dass nach diesem Zeitpunkt eine deutliche Zytokinsekretion zu erwarten ist und ein DNA-Schaden (γ H2AX) und somit eine Caspasen- und CAD-Aktivierung nachgewiesen werden kann (69).

Abbildung 16A zeigt, dass in allen nicht-infizierten Zellen keine IL-6-Sekretion messbar ist. Nach der 24-stündigen Infektionsdauer ist im Überstand der Kontroll-, Smac- und Caspase-9-defizienten Zellen kein IL-6-Konzentrationsunterschied messbar. Allerdings ist im Überstand der PARL- und Apaf-1-defizienten Zellen eine signifikant höhere Menge an IL-6 gegenüber den Kontrollzellen nachweisbar. Unerwarteterweise sezernieren die Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen nicht weniger IL-6. Die Menge an IL-6 im Überstand der doppelt defizienten Zellen ist gegenüber Kontrollzellen signifikant erhöht.

Ergänzend zu IL-6 wurde auch im Überstand der einzelnen Zellen die IL-8-Konzentration ermittelt. Abbildung 16B zeigt nach Infektion mit *Salmonella* Typhimurium, dass im Überstand der Smac-, Apaf-1- und Caspase-9-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion der IL-8-Konzentration im Vergleich zu der Kontrollzelle zu messen ist. Die PARL-defizienten Zellen verhalten sich vergleichbar den Kontrollzellen bezüglich der IL-8-Sekretion. Auffallend ist, dass wie schon bei der IL-6-Sekretion eine signifikant höhere Menge an IL-8 in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen detektierbar ist. Bezogen auf die CXCL-1-Sekretion verhalten sich die Smac- und PARL-defizienten Zellen nach erfolgter Infektion vergleichbar zu den Kontrollzellen (Abbildung 16C). Allerdings ist im Überstand der Apaf-1-defizienten Zellen eine signifikant höhere CXCL-1-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar. Den IL-6-Sekretionsdaten folgend ist auch bezüglich der CXCL-1-Sekretion Unterschied zwischen den Apaf-1- und Caspase-9-defizienten Zellen zu beobachten. Im Überstand der Caspase-9-defizienten Zellen ist nur eine IL-6-Konzentration von knapp 200 pg/mL detektierbar. Im Überstand der Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen ist kein CXCL-1-Konzentrationsunterschied gegenüber den Kontrollzellen erkennbar.

Um mögliche Unterschiede in der Kinetik der Zytokinsekretion zwischen den Zelllinien zu berücksichtigen und zu erfassen, wurden zusätzliche Analysezeitpunkte nach 5-, 18- und 30-stündiger Infektion in die Kinetik-Untersuchung aufgenommen. Da die bisherigen Ergebnisse daraufhin deuten, dass der mitochondriale Apoptose-Apparat keine Rolle in der Salmonellen-vermittelten Zytokinsekretion spielt, wurden zusätzlich CAD-defiziente Zellen analysiert. Wie in vorherigen Kapiteln beobachtet werden konnte, scheint CAD eine Rolle in der Zytokinsekretion zu spielen.

Erneut wurde das pro-inflammatorische Zytokin, IL-6 gemessen. Nach 5-stündiger Infektion ist in allen hier verwendeten Epithelzelllinien keine nennenswerte IL-6-Sekretion feststellbar (Abbildung 16D). Nach 18-stündiger Infektionsdauer ist hingegen ein Anstieg der IL-6-Sekretion in allen Zelllinien zu verzeichnen. Im Überstand der Smac-defizienten Zellen ist nach 18-stündiger Infektion eine leichte, wenn doch signifikant höhere IL-6-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennbar, während die CAD-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion aufweisen. Am deutlichsten ist der Unterschied zu den Bax/Bak-

doppelt-defizienten Zellen, denn im Überstand dieser Zellen ist signifikant mehr IL-6 gegenüber den Kontrollzellen messbar (knapp 680 pg/mL). Nach 30-stündiger Infektion ist in allen Zelllinien außer den CAD-defizienten Zellen ein deutlicher Anstieg der IL-6-Sekretion auf >750 pg/ml nachweisbar. Der Unterschied zwischen den Kontroll- und Bax/Bak-doppelt-defizienten verringert sich jedoch, wohingegen im Vergleich zu den CAD-defizienten Zellen eine deutlich signifikante Reduktion der IL-6-Sekretion gemessen wird.

Bezogen auf die IL-8-Sekretion sind zwischen den Zelllinien, außer den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen, zwischen 5- und 18-stündiger Infektion keine nennenswerte Unterschiede detektierbar (Abbildung 16E). Besonders zu betonen ist, dass im Überstand der Bax/Bak doppelt defizienten Zellen bereits nach 5-stündiger Infektion eine signifikant höhere IL-8-Konzentration gegenüber Kontrollzellen nachweisbar ist. Ähnlich den IL-6-Sekretionsergebnissen ist im Überstand der CAD-defizienten Zellen signifikant weniger IL-8 gegenüber Kontrollzellen nachweisbar, allerdings findet gegenüber der unifizierten Kontrolle eine deutliche Induktion der IL-8-Sekretion statt.

Nach 18-stündiger Infektion ist die CXCL-1-Sekretion in den CAD- und Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen signifikant höher als in den Kontrollzellen. Dementgegen ist im Zellkulturüberstand der Kontroll-, Smac- und CAD-defizienten Zellen kein CXCL-1-Konzentrationsunterschied zu messen. Lediglich im Überstand der Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen ist eine signifikant höhere CXCL-1-Konzentration im Vergleich zu der Kontrollzellen detektierbar.

Abschließend ist anzumerken, dass CAD bei der IL-6-Sekretion vermutlich eine Rolle spielen könnte. Ein Effekt von Bax und Bak war nicht erkennbar; allerdings deuten die Effekte der CAD-, Apaf-1 und Bax/Bak-doppel-Defizienz auf eine Aktivierung und Beteiligung des Apoptosewegs hin. Die Regulation insbesondere von IL-6 ist ungeklärt, so dass nur limitiert verstanden werden kann, welche Signale anders verlaufen.

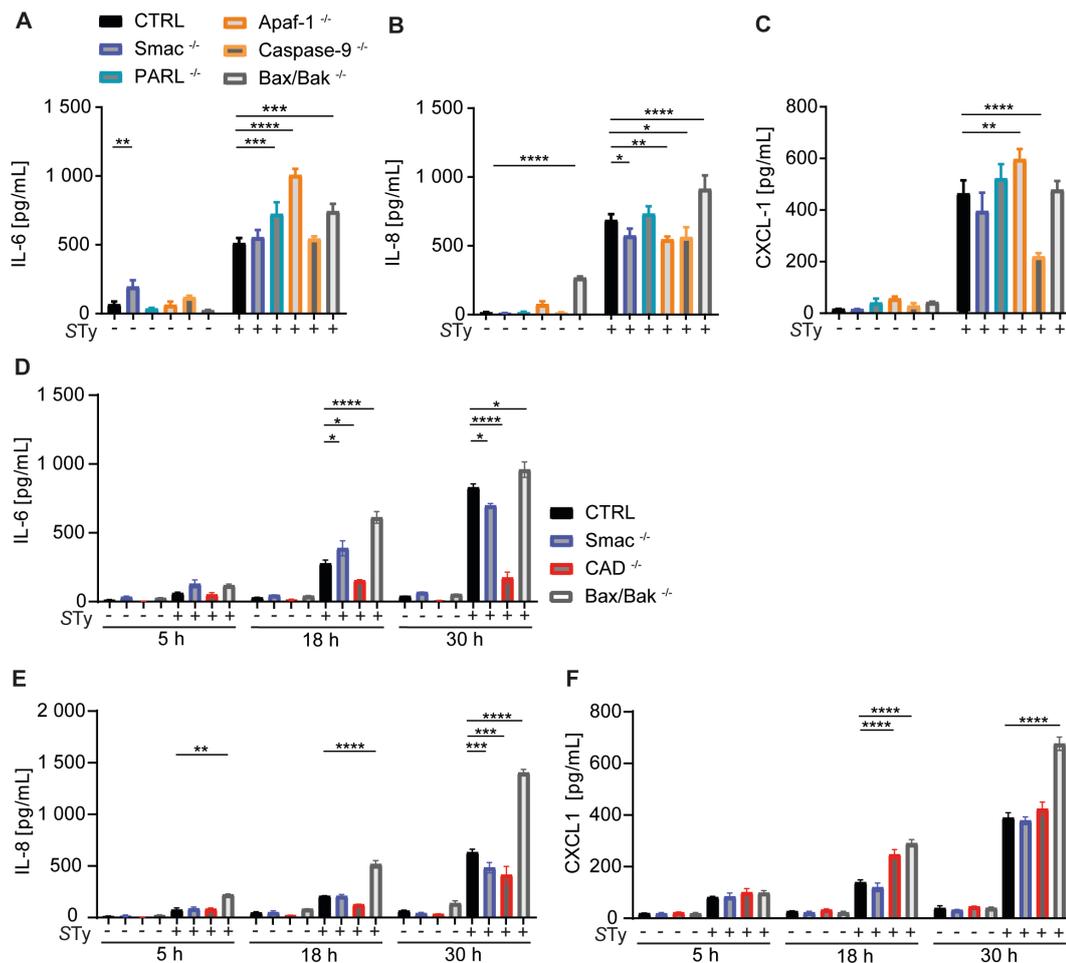


Abbildung 16: Zytokinsekretion infolge der Salmonellen-Infektion erfolgt mit geringem Einfluss von Proteinen der Apoptosesignaltransduktion

HeLa-Kontrollzelllinien (CTRL) oder Gen defiziente HeLa-Zelllinien (Bax/Bak-doppeltdefizient, Smac, PARL, Apaf-1, Caspase-9 und CAD) wurden mit *Salmonella* Typhimurium (MOI=50) infiziert. Überstände wurden mittels ELISA auf Zytokine analysiert. (A) IL-6 nach 24 h. (B) IL-8 nach 24 h. (C) CXCL-1 nach 24 h. (D) IL-6 nach 5 h, 18 h und 30 h. (E) IL-8 nach 5 h, 18 h und 30 h. (F) CXCL-1 nach 5 h, 18 h und 30 h. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM von n=3-5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Zwei-Wege-Varianz (*Two-way*-ANOVA) überprüft (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

1.9. Smac-abhängige Immunzellrekrutierung

Wie bereits im vorherigen Kapitel (IV 1.8) gezeigt werden konnte, spielen Proteine des Apoptosesignalwegs eine Rolle in der Infektionsabwehr. Auch im Rahmen der *Helicobacter pylori* Infektion konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* den subletalen Apoptosesignalweg aktiviert und Smac dabei eine entzündungsfördernde Rolle spielt. Smac aktiviert den alternativen NF- κ B-Signalweg und fördert damit die Sekretion von Chemokinen (317). Ebenso konnte in Studien gezeigt werden, dass

das Bakterium *Shigella flexneri* im Gegensatz zu apoptotischen Stimuli die Calpain-abhängige Spaltung von BID aktiviert, für die Freisetzung von Smac, dass der entzündlichen Wirkung von XIAP entgegenwirkt, ohne die Apoptose auszulösen. (318).

Um die Rolle von Smac in der Aktivierung des Immunsystems in einem weiteren Infektionsmodell zu untersuchen, wurden Smac-defiziente Mäuse intravaginal mit dem obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia muridarum* infiziert. Heterozygote Wurfgeschwister dienten als Kontrollgruppe (Kontrollmäuse). Die in den Versuchen verwendeten Mäuse haben einen C57BL/6 genetischen Hintergrund. Die Infektionsdauer betrug 4 Tage, da dies dem akuten Stadium der Infektion entspricht, in dem die angeborene Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt. Ziel war es, mögliche Unterschiede in der Immunzellzusammensetzung im Genitaltrakt in Abhängigkeit von Smac zu identifizieren. Nach erfolgreicher Infektion wurde der Genitaltrakt in zwei Teile unterteilt. Zum einen in die beiden Uterushörner, die für die spätere Analyse zusammengefasst wurden sowie das Ovidukt und das Ovar (Abbildung 17A). Die Aufteilung erfolgte, um die einzelnen Abschnitte in Relation zur Infektionsdauer und Immunzellzusammensetzung setzen zu können. Nach dem Verdau der jeweiligen Abschnitte wurden die Immunzellen isoliert und spezifisch extrazellulär und intrazellulär gefärbt, um anschließend die einzelnen Immunzellen anhand ihrer Marker im Durchflusszytometer (FACS Fortessa™) charakterisieren zu können.

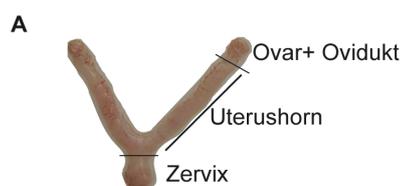


Abbildung 17: Muriner weiblicher Genitaltrakt

(A) Repräsentative Darstellung des weiblichen murinen Genitaltraktes mit den erfolgten Unterteilungen für spätere Analysen.

Die Bestimmung des Anteils an myeloiden Zellen, insbesondere des Anteils von Neutrophilen und monozytären Zellen, erfolgte über die Expression von Ly6G, Ly6C und CD11b.

In den Uterushörnern uninfizierter Kontrollmäuse und Smac-defizienter Mäuse liegt die Anzahl an Monozyten meist unter 50 (Abbildung 18A). Nach erfolgter Infektion mit 5×10^5 IFU *Chlamydia muridarum* sind in den Uterushörnern der Kontrollmäuse am vierten Tag *post infectionem* (p.i.) bzw. vier Tage nach der Infektion (4 T.n.I.) deutlich mehr Monozyten nachweisbar (knapp 500.000) als bei den Smac-defizienten Mäusen (ca. 100.000). Im Gegensatz dazu sind im oberen Abschnitt des Genitaltrakts (Ovidukt und Ovar) mehr Monozyten in den Smac-defizienten Mäusen nachweisbar (knapp 2.000 Monozyten).

Ein noch deutlicherer Unterschied zeigt sich bei der absoluten Anzahl an neutrophilen Granulozyten nach erfolgter Infektion (Abbildung 18B). Erneut sind in den Uterushörnern der Kontrollmäuse deutlich mehr Neutrophile nachweisbar, während im Ovidukt/Ovar eine deutliche Reduktion der Anzahl an Neutrophilen gegenüber den Smac-defizienten Mäusen detektierbar ist. Somit ist im oberen Genitaltrakt der Smac-defizienten Mäusen eine deutlich höhere Infiltration beider myeloider Zelltypen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu verzeichnen.

Neben den beschriebenen myeloiden Zellen wurden auch verschiedene Lymphozytenpopulationen mittels der Marker TCR β , CD3, CD4, NK1.1 und Eomes im Durchflusszytometer charakterisiert. Die NK-Zellen wurden wie folgt definiert: CD45+, Lin (CD3, CD5, CD19, TCR β , TCR $\gamma\delta$, F4/80, Fc ϵ R1 α , Ly6G)-, NK1.1+, Eomes+. Im Gegensatz zur absoluten Zellzahl von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten ist die Anzahl an NK-Zellen in den Uterushörnern der Kontrollmäuse nach Infektion deutlich geringer und beträgt im Durchschnitt 150.000 (Abbildung 18C). Dennoch ist eine Differenz der Zellzahl in den Uterushörnern zwischen den Kontrollmäusen und den Smac-defizienten Mäusen festzustellen. Im Ovidukt/Ovar der Smac-defizienten Mäuse ist bereits ohne erfolgte Infektion eine vermehrte Anzahl an NK-Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen detektierbar (13.000 *versus* 2.000). Ebenso ist nach der Infektion im oberen Genitaltrakt ein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Mausgenotypen zu verzeichnen, da in den Smac-defizienten Mäusen deutlich mehr NK-Zellen nachweisbar sind (knapp 28.000 *versus* 5.000).

Die Population der ILC-1-Zellen wurde wie folgt definiert: CD45+, Lin-, NK1.1+, Eomes-. Die absolute Zellzahl der ILC-1-Zellen (Abbildung 18D) ist insgesamt sehr gering, selbst in den Uterushörnern der Kontrollmäusen sind nach der Infektion nur durchschnittlich 12.000 ILC-1 Zellen nachweisbar, und es sind nur geringe

Unterschiede zwischen den beiden Mausgenotypen zu erkennen. Ähnliche Beobachtungen können auch im Ovidukt/Ovar gemacht werden. Hier ist in den uninfizierten Kontrollmäusen lediglich eine minimal höhere Anzahl von ILC-1-Zellen im Vergleich zu den Smac-defizienten Mäusen nachweisbar. Ebenso ist nach erfolgter Infektion im Ovidukt/Ovar der heterozygoten Mäuse kaum ein Anstieg der Infiltration von ILC-1 Zellen detektierbar.

Zuletzt wurde die Anzahl der T-Zellen quantifiziert (Abbildung 18E), indem sie anhand der Marker CD3+, CD4 und TCR β + berechnet wurden. Zwischen den uninfizierten Mausgenotypen sind keine Unterschiede in den Uterushörnern festzustellen, während nach der Infektion mehr T-Zellen in die Uterushörner der Kontrollmäusen infiltrieren als bei den Smac-defizienten Mäusen (knapp 250.000 *versus* 50.000). Allerdings ist innerhalb dieser Gruppe eine deutliche Varianz zu beobachten, weshalb die Unterschiede gegenüber den Smac-defizienten Mäusen nicht signifikant sind. Im Gegensatz dazu sind im Ovidukt/Ovar deutliche Unterschiede zwischen den Mausgenotypen messbar. Obwohl die uninfizierten Kontrollmäuse eine minimal höhere T-Zell-Anzahl aufweisen als die Smac-defizienten Mäuse, sind nach der Infektion signifikante Unterschiede feststellbar.

Insgesamt zeigen die Daten der Immunzellpopulationen, dass nicht nur deutliche Unterschiede in der Anzahl der Immunzellen zwischen den Smac-defizienten Mäusen und den Kontrollmäusen zu beobachten sind, sondern auch Unterschiede in der Lokalisation innerhalb des murinen Genitaltraktes. Smac hat also einen Einfluss auf die Immunabwehr gegen *C. muridarum*.

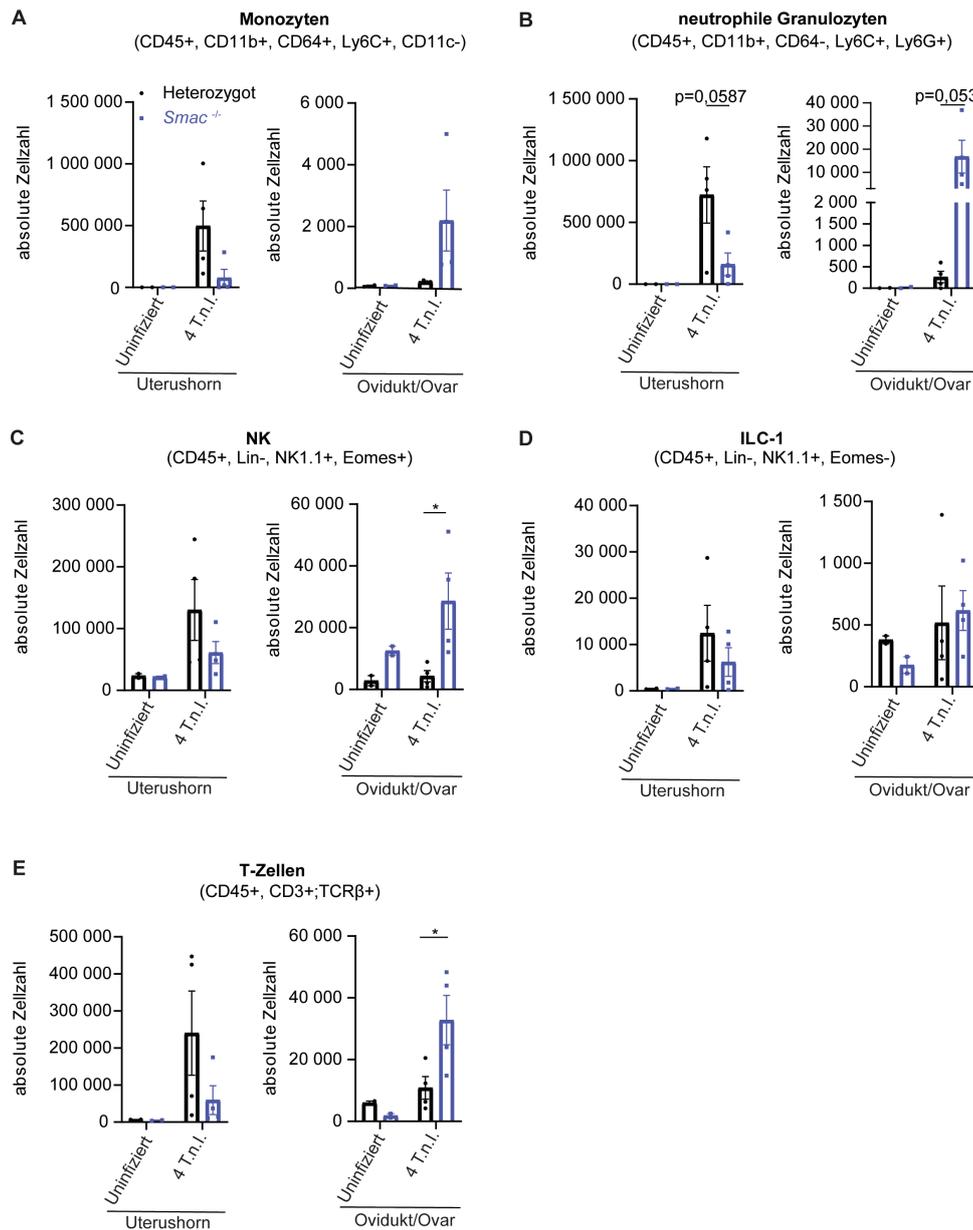


Abbildung 18: Reduzierte Infiltration von Immunzellen im unteren Genitaltrakt der Smac-defizienten Mäuse

Heterozygote und Smac-defiziente Mäuse wurden intravaginal mit *C. muridarum* (5×10^5 IFU) infiziert. Die Genitaltrakte wurden 4 Tage nach der Infektion herauspräpariert und die infiltrierenden Zellen isoliert. Isolierte Immunzellen wurden mit Antikörpern markiert und im Durchflusssytometer analysiert (vgl. Abbildung 6 und 7).

Absolute Zellzahlen wurden mittels einer definierten Anzahl von „reference beads“ ermittelt. (A) Absolute Anzahl der isolierten monozytären Zellen (definiert als CD45+, CD11b+, CD64+, Ly6C+, CD11c-). (B) Absolute Anzahl der isolierten Neutrophilen (definiert als CD45+, CD11b+, CD64-, Ly6C+, Ly6G+). (C) Absolute Anzahl der isolierten NK-Zellen (definiert als CD45+, Lin (CD3, CD5, CD19, TCRβ, TCRγδ, F4/80, FcεR1α, Ly6G) -, NK1.1+, Eomes+). (D) Absolute Anzahl der isolierten ILC-1-Zellen (definiert als CD45+, Lin-, NK1.1+, Eomes-). (E) Absolute Anzahl der isolierten T-Zellen (definiert als CD45+, CD3+, TCRβ+). Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM mit folgender

Mauszahl n=6 (4x infiziert und 2x uninfiziert) je Genotyp. Die Signifikanzen wurden mittels Zwei-Wege-Varianz (*Two-way-ANOVA*) überprüft (* $p < 0,05$).

1.10. Smac-abhängige Chemokinexpression

Im vorherigen Kapitel wurde bereits eine erhöhte Infiltration von Immunzellen im oberen Genitaltrakt der Smac-defizienten Mäusen nach viertägiger Chlamydien-Infektion beobachtet. Nun stellt sich die Frage, welche Signale von infizierten Epithelzellen zu dieser erhöhten Infiltration führen könnten. Die Rekrutierung bzw. Infiltration von Immunzellen ist abhängig von Chemokinen, die als Botenstoffe fungieren (327). Verschiedene Chemokine rekrutieren bestimmte Immunzelltypen. In diesem Zusammenhang wird untersucht, ob bereits bei der Sekretion von Chemokinen Unterschiede zwischen Smac-defizienten Mäusen und WT-Kontrollmäusen festzustellen sind. Die relativen Chemokin-Mengen wurden anhand der Genexpression mittels RT-qPCR aus isolierter RNA aus dem jeweiligen Genitaltraktabschnitt bestimmt, nämlich Ektozervix, Endozervix, unterer Uterusabschnitt und oberer Uterusabschnitt (19A).

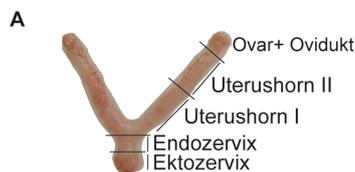


Abbildung 19: Abschnitte des murinen FGT für RNA-Isolation

(A) Repräsentative Unterteilung des murinen Genitaltraktes für die RNA-Isolation mit anschließender RT-qPCR zur Ermittlung der Chemokinexpression.

Die Ermittlung der Chemokin-Menge erfolgte mittels der Berechnung des „*log fold change*“ und wurde auf die uninfizierte WT-Kontrollgruppe normiert (=1). Für die Experimente wurde eine Infektionsdauer von 24 h gewählt, da Rank *et al.* zeigen konnten, dass nach diesem Infektionszeitraum bereits Chemokine im unteren Zervix-Abschnitt, auch Ektozervix genannt, nachweisbar sind (319). Zu diesem frühen Zeitpunkt sind keine infiltrierenden Immunzellen nachweisbar, so dass sehr wahrscheinlich infizierte Epithelzellen die Hauptquelle für die nachgewiesenen Zytokine/Chemokine sind.

Eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten spielt CXCL-1 mit dem korrespondierenden Rezeptor CXCR2. In der Ektozervix ist

signifikant mehr CXCL-1 im WT verglichen zu den Smac-defizienten Mäusen nachzuweisen (Abbildung 20A). Für die Endozervix zeigt sich nach 24-stündiger Infektion nur ein minimaler Unterschied zwischen den beiden Mausgenotypen und gegenüber den unifizierten Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Expression der Chemokine auf die Ektozervix beschränkt ist.

Die Expression von CXCL-5, die ebenfalls für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten notwendig ist, wird in Abbildung 20B dargestellt. Obwohl in der Ektozervix diesmal kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgenotypen bezüglich der CXCL-5-Expression vorliegt, ist dennoch eine Reduktion der CXCL-5-Expression in den Smac-defizienten Mäusen gegenüber den WT-Mäusen messbar. In der Endozervix hingegen liegt kein Unterschied in Bezug auf die CXCL-5-Expression zwischen den Genotypen vor und vor allem in den WT-Mäusen ist eine deutlich schwächere Expression im Vergleich zur Ektozervix beobachtbar.

Das Chemokin CXCL-10 ist unter anderem für die Rekrutierung von NK- und CD8⁺-Zellen in das Entzündungsgebiet verantwortlich. Der größte Unterschied zwischen den Mausgenotypen wird bei diesem Chemokin beobachtet, wobei die höchste Expression in der Ektozervix der WT-Mäuse in der Anfangsphase der Infektion gemessen wird. Der CXCL-10-Spiegel ist um das 130-fache höher als bei der Smac-defizienten Maus (Abbildung 20C). In der Endozervix ist die CXCL-10-Expression in beiden Genotypen nahezu nicht nachweisbar.

Bei CCL-2, das für die Infiltration von Monozyten wichtig ist, zeigt sich nach Infektion mit *C. muridarum* eine höhere Expression in den WT-Mäusen im Vergleich zu den Smac-defizienten Mäusen (Abbildung 20D). Der Unterschied ist jedoch aufgrund der deutlichen Varianz innerhalb der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant.

Ähnliche Ergebnisse werden auch bei der CCL-4-Expression (Abbildung 20E) beobachtet, ein Chemokin, das für die NK- und Makrophagen-Infiltration notwendig ist. Erneut ist eine höhere Expression in den WT-Mäusen in der Ektozervix zu beobachten als in den Smac-defizienten Mäusen. In der Endozervix sind deutlich geringere Mengen in beiden Genotypen detektierbar.

In Abbildung 20F ist eine deutliche Reduktion der CCL-7-Expression, die für die Infiltration von Monozyten benötigt wird, in den Smac-defizienten Mäusen im

Vergleich zu den WT-Mäusen in der Ektozervix zu beobachten. Wie bei anderen Chemokinen zuvor beschrieben, kommt es auch hier in der Endozervix zu keinem deutlichen Anstieg der Expression in beiden Mausgenotypen.

Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese, dass aufgrund der deutlich reduzierten Chemokin-Expression in den Smac-defizienten Mäusen eine verstärkte Infiltration von Immunzellen vermutlich ausbleibt und somit die Chlamydien schneller und leichter aufsteigen können, was zur Folge hat, dass bereits nach vier Tagen die Immunzellen in solch großer Anzahl im Ovidukt nachweisbar sind.

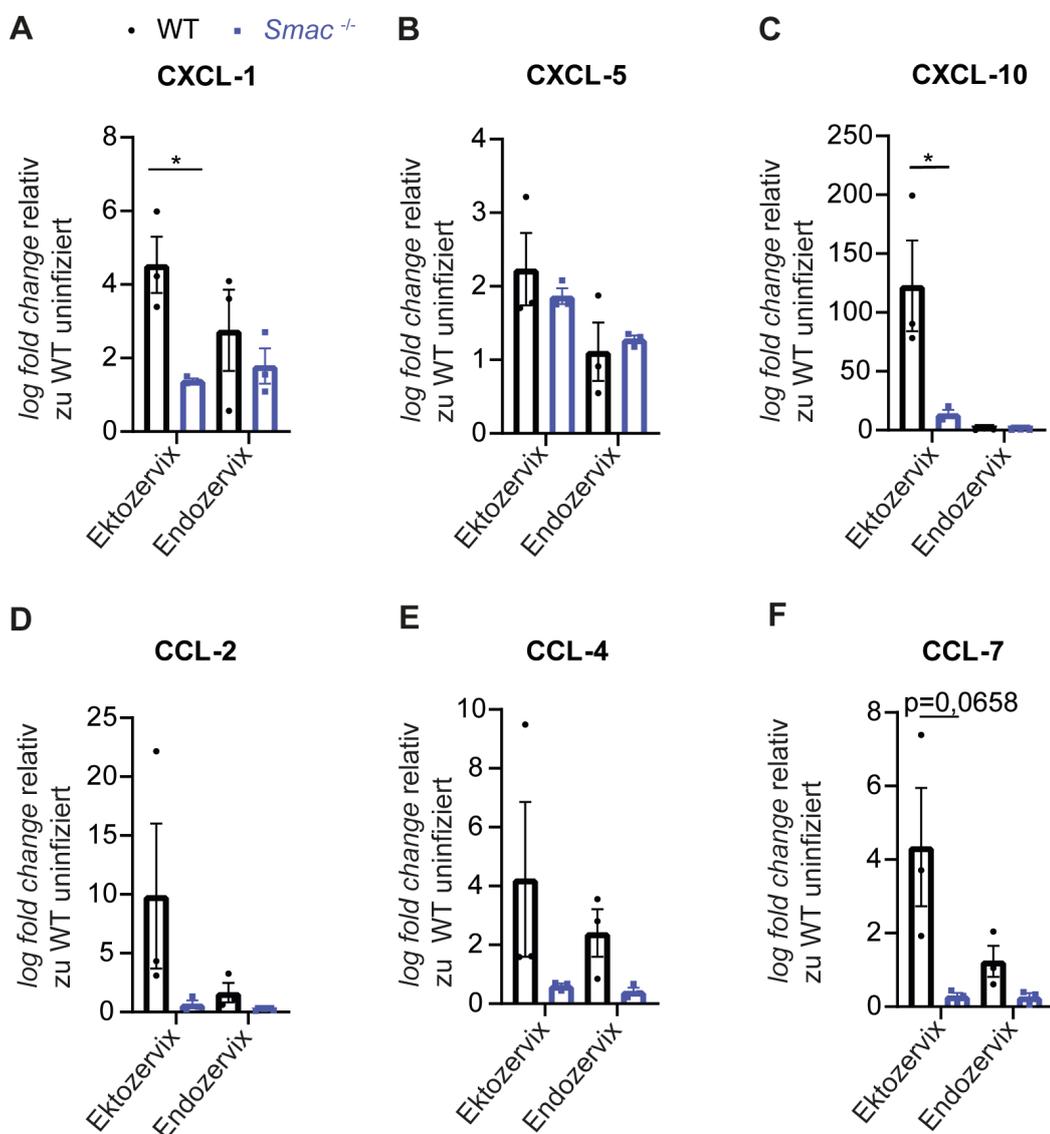


Abbildung 20: Geringe Chemokinexpression bei Smac-defizienten Mäusen

Wildtyp und Smac-defiziente Mäuse wurden intravaginal mit *C. muridarum* (5×10^5 IFU) infiziert. Die Genitaltrakte wurden 24 h nach der Infektion herauspräpariert und die RNA wurde aus der Ekto- und Endozervix extrahiert, und nachfolgend erfolgte die RT-qPCR. Relative mRNA-Spiegel von (A) CXCL-1 (B) CXCL-5 (C) CXCL-10 (D) CCL-2

(E) CCL-4 und (F) CCL-7 normalisiert auf nicht infizierte Wildtyp Mäuse (normalisiert auf GAPDH) sind dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte/SEM mit folgender Mauszahl n=6 je Genotyp. Signifikanz der Mittelwerte wurde mittels zweiseitigem ungepaarten t-Test überprüft (* p< 0,05).

1.11. Erhöhte Chlamydienlast in Smac-defizienten Mäusen

Den Beobachtungen aus dem vorherigen Kapitel folgend wird nun die Frage geklärt, ob gemessene Unterschiede bezüglich der Chemokinexpression mit Unterschieden in der Anzahl chlamydialer Genomkopien korrelieren.

Frühere Studien haben gezeigt, dass Chlamydien bis zum 28.Tag nach der Infektion in der Zervix nachweisbar sind (329). Zur Quantifizierung der Bakterienlast wurde der Genitaltrakt in Ektozervix, Endozervix und Uterushorn I aufgeteilt, wobei in Abbildung 21A nur die Ergebnisse der Ektozervix dargestellt sind. Die DNA wurde aus jedem Abschnitt des Genitaltrakts isoliert, und die Genomkopien von *C. muridarum* wurden mittels RT-qPCR quantifiziert und als Genomkopien pro mg Gewebe angegeben. Nach viertägiger Infektion wurde die Bakterienlast nach Isolation von Chlamydien aus Vaginalabstrichtupfern mittels Reinfektion von HeLa-Zellen quantifiziert und als *Inclusion Forming Units* (IFUs)/Abstrich berechnet. Da der Abstrichtupfer nur den Gebärmutterhalsbereich abdeckt kann die Bakterienlast in den oberen Genitaltraktabschnitten nicht mithilfe dieser Methode gemessen werden.

In Abbildung 21A ist zu sehen, dass bereits 24 h nach der Infektion mehr chlamydiale Genomkopien /mg Gewebe in den Smac-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen detektierbar sind.

Nach viertägiger Infektion ist dieser Unterschied zwischen den beiden Mausgenotypen bereits signifikant (Abbildung 21B). Somit ist in der Anfangsphase der Infektion bei Smac-defizienten Mäusen eine höhere Anzahl an chlamydialen Genomkopien und somit der Chlamydienlast nachweisbar und eine deutlich reduzierte Expression von Chemokinen zu beobachten.

Dies könnte möglicherweise eine Erklärung für das schnellere Aufsteigen der Chlamydien in den oberen Genitaltrakt sein.

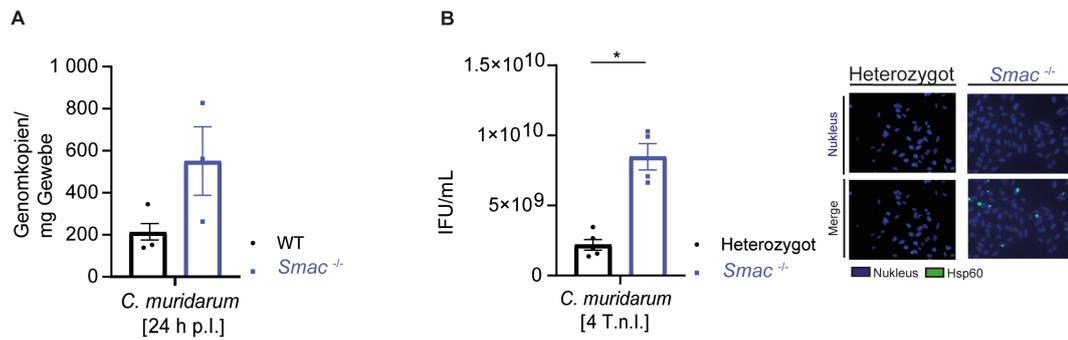


Abbildung 21: Erhöhte messbare Chlamydienlast in den Smac-defizienten Mäusen

Wildtyp (24 h p.i.) sowie heterozygote (4 T.n.I.) und Smac-defiziente Mäuse wurden intravaginal mit *C. muridarum* (5×10^5 IFU) infiziert. **(A)** Bakterielle Last nach 24-stündiger Infektionsdauer. DNA wurde isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. DNA von 1×10^7 IFUs von *C. muridarum* wurde isoliert, verdünnt und anschließend zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Gezeigt ist die absolute Anzahl von *C. muridarum*-Genomkopien/mg Gewebe. **(B)** Vaginalabstriche wurden am 4. Tag nach der Infektion genommen und daraus die Chlamydien isoliert. Die IFU-Konzentration wurde über Reinfektion von HeLa-Zellen bestimmt. Es wurden $n=3$ (24 h p.i.) oder $n=4$ (4 T.n.I.) je Genotyp und pro Behandlung verwendet. Signifikanz der Mittelwerte wurde mittels zweiseitigem ungepaarten t Test (A) und Zwei-Wege-Varianz (*Two-way*-ANOVA) (B) überprüft (* $p < 0,05$).

V. DISKUSSION

Wie bereits Brokatzky *et al.* zeigen konnten, ist eine Zytokinsekretion sowohl nach subletalen pro-apoptotischen Stimuli als auch infolge einer Infektion mit Pathogenen nachweisbar. Nach diesen subletalen Stimuli erfolgt die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine abhängig vom mitochondrialen Apoptoseapparat (8). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus, inwiefern der mitochondriale Apoptoseapparat die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine beeinflusst, ist bisher weitestgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Rolle unterschiedlicher anti- und pro-apoptotischer Proteine, sowie weiterer am Apoptosesignalweg beteiligter Proteine bezüglich Ihres Einflusses auf die Zytokinsekretion während einer subletalen Aktivierung des Apoptoseapparates analysiert. Die subletale Aktivierung des Apoptosesignalwegs wurde durch eine chemische Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 (Behandlung mit S63845) oder Bcl-X_L, Bcl-2 und Bcl-w (Behandlung mit ABT-737) erzielt. Die Analyse der Zytokinsekretion erfolgte vor dem Hintergrund der gemessenen Caspase-3-Aktivierung als Marker für eine erfolgte Aktivierung des subletalen Apoptosesignalwegs (Zelltod). Dieser Nachweis der subletalen Apoptose wurde gewählt, da bei der limitierten Aktivierung des Apoptosesignalwegs nur ein geringer Anteil der Caspase-3 aktiviert wird.

Des Weiteren wurde die Zytokinsekretion nachfolgend einer *in vitro* erfolgten *Salmonella* Typhimurium Infektion analysiert. Zum Abschluss wurde die Rolle von Smac (wichtige Komponente des intrinsischen Apoptosesignalwegs) im Rahmen einer *in vivo* erfolgten *Chlamydia muridarum* Infektion bezüglich der Aktivierung des Immunsystems näher betrachtet. Dafür wurde zum einen die Chlamydienlast während der Infektion bestimmt, die Immunzellzusammensetzung des Infiltrats analysiert und die Chemokinexpression im zervikalen Bereich überprüft.

1. Unterschiedliche Signalwege resultieren in der IL-8-/CXCL-1- und Il-6-Sekretion

Durch die Behandlung von HeLa-Zellen mit den BH3-Mimetika S6845 (Mcl-1-Inhibition) und ABT-737 (Bcl-2-, Bcl-w- und Bcl-X_L-Inhibition) wird eine subletale Aktivierung des Apoptoseapparates ausgelöst (3, 8). Die Zytokinsekretion von IL-8 und CXCL-1 wurde unter diesen Bedingungen in HeLa-Zellen mit Defizienz der Apoptose-assoziierten Proteine (Bax, Bak, Smac, PARL, XIAP, Apaf-1, Caspase-9, CAD und Caspase-8) untersucht. In Abwesenheit der beiden porenbildenden pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak erfolgt weder eine Caspase-3-Aktivierung noch eine Zytokinsekretion (in Abbildung 10A-D; sowie (8)). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit von MOMP für die Sekretion von IL-8 und CXCL-1. Nachfolgend MOMP („stromabwärts“) kann die Sekretion von Zytokinen über diverse Signalwege erfolgen. Dies kann entweder durch freigesetzte Faktoren aus den Mitochondrien, beispielsweise mitochondriale DNA (mtDNA) oder durch die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien, wie Smac, geschehen. Letztere können ihrerseits zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3/7 beitragen. Das Fehlen des mitochondrialen Intermembranraumproteins Smac oder die Blockierung der Bindung von Smac an IAPs aufgrund des Fehlens der mitochondrialen Protease PARL führt zu einer deutlich verminderten Sekretion von IL-8 und CXCL-1 im Vergleich zu den Kontrollzellen nach der BH3-Mimetika Behandlung (Abbildung 14D, F). HeLa-Zellen mit einer Smac oder PARL Defizienz zeigen dem ergänzend auch eine signifikant reduzierte Aktivierung von Caspase-3 (Abbildung 14A). Für eine weiterführende Untersuchung, ob die Aktivierung der Effektorcaspasen für die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-8/CXCL-1) eine Rolle spielt, wurden Apaf-1- und Caspase-9-defiziente HeLa-Zellen mit den jeweiligen BH3-Mimetika behandelt. Aufgrund des Fehlens von Apaf-1 ist die Aktivierung von Caspase-9 und infolgedessen die Aktivierung von Caspase-3 nach einer Stimulierung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs blockiert (Abbildung 15A). Die Defizienz von Apaf-1 oder Caspase-9 unterdrückt außerdem die Sekretion von IL-8 und CXCL-1 nahezu vollständig (Abbildung 15D, F). Dies deutet somit darauf hin, dass die Sekretion von IL-8 und CXCL-1 caspasenabhängig erfolgt. Untermauert wird diese Erkenntnis dadurch, dass in den S63845-behandelten Kontrollzellen (CTRL) erst nach Inhibition aller Caspasen mittels eines pan-

Caspase-Inhibitors (Z-VAD-FMK) eine signifikante Reduktion der IL-8/CXCL-1-Sekretion festzustellen ist (Abbildung 9C, D). Nachfolgend MOMP können aktivierte Caspasen diverse Substrate spalten und aktivieren, wozu auch CAD gehört. Brokatzky *et al.* konnten bereits eine mögliche Beteiligung von CAD im Zusammenhang mit der Zytokinsekretion nach subletalen Stimuli aufzeigen (8). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zur Vervollständigung der Hypothese ebenfalls CAD-defiziente Zellen mit BH3-Mimetika behandelt. In diesen CAD-defizienten Zellen ist ebenfalls eine reduzierte IL-8- und CXCL-1-Sekretion nachfolgend subletaler Stimuli messbar (Abbildung 15D, F). Dies verdeutlicht die Beteiligung von CAD im Rahmen der IL-8/CXCL-1-Sekretion. Diese weitere Beobachtung ist konsistent mit dem Modell, dass nachfolgend der Caspasenaktivierung ein CAD-vermittelter DNA-Schaden durch die Spaltung von ICAD entsteht (3, 8). Studien konnten beispielsweise zeigen, dass DNA-Schäden in Form von Mikronuklei als Folgen der Schäden direkt mit einer entzündlichen Immunreaktion assoziiert sein können (320, 321). Eine weitere Möglichkeit stellen beispielsweise die Proteinkinasen (ATM, ATR, DNA-PK) im Rahmen der *DNA damage response* (DDR) dar, die eine proinflammatorische Genexpression durch IRF3/7 oder NF- κ B vermitteln können (322, 323, 324). Ein mögliches Szenario wäre, dass im Rahmen der DNA-Schadensantwort NEMO beispielsweise durch die ATM-Kinase phosphoryliert wird. Weiter konnte bereits gezeigt werden, dass der NF- κ B-Signalweg die Sekretion von IL-8 zur Folge haben kann (325). Die genaue Art und Weise, wie CAD die Sekretion von Zytokinen in diesem Szenario beeinflusst, bleibt vorerst unklar. Dennoch kann in diesem Zusammenhang impliziert werden, dass IL-8/CXCL-1 im intrinsischen Apoptosesignalweg als Folge der Caspasen- und CAD-Aktivierung sekretiert wird. Diese Beobachtung harmoniert ebenfalls mit der Feststellung unserer Forschungsgruppe, dass die isolierte Aktivierung von CAD ausreichend ist, um eine IL-8-Sekretion zu induzieren (Moeed *et al.*, unveröffentlicht).

Neben den beiden genannten Zytokinen sollten in dieser Studie auch Schlussfolgerungen und Erklärungen für die IL-6-Sekretion gezogen werden. Es wurde bereits nachgewiesen, dass in ABT-737-sensitiven Zellen hohe Konzentrationen dieses BH3-Mimetikums die IL-6-Sekretion weniger effizient induzieren (8). Die Ursache für diesen Zusammenhang wird in der Aktivierung der Effektorcaspasen durch ABT-737 vermutet.

Eine starke Aktivierung der Effektorcaspasen kann die IL-6-Sekretion unterdrücken (9). Daher besteht die Annahme, dass eine reduzierte Aktivierung der Effektorcaspasen für die IL-6-Sekretion erforderlich sein könnte. Um zu untersuchen, ob der mitochondriale intrinsische Signalweg hierbei eine Rolle spielt, wurden erneut Zellen mit Doppeldefizienz von Bax und Bak mit den BH3-Mimetika behandelt. In diesen doppelt-defizienten Zellen kann weder eine Induktion der IL-6-Sekretion noch eine Aktivierung von Caspase-3 nachgewiesen werden (Abbildung 10A, B). Somit könnte der mitochondriale Signalweg auch eine Rolle in der IL-6-Sekretion spielen.

Um detaillierter zu untersuchen welche Faktoren/Proteine nach der Aktivierung von Bax/Bak eine Rolle spielen, wurden HeLa-Zellen mit Defizienz der Caspasen-aktivierenden bzw. assoziierten Proteine (Apaf-1, Caspase-9, Smac und PARL) sowohl mit den BH3-Mimetika als auch dem pan-Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) behandelt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bezüglich der IL-8-Sekretion zeigt sich in den Apaf-1-, Caspase-9-, Smac- und PARL-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikante Reduktion der IL-6-Sekretion (Abbildung 14B und Abbildung 15B). Zusätzlich zeigt sich in den Kontrollzellen, selbst nach einer umfassenden Blockade sämtlicher Caspasen, keine erkennbare Reduktion von IL-6. Dies liefert einen klaren Anhaltspunkt dafür, dass die IL-6-Sekretion über einen anderen Signalweg als die IL-8-Sekretion verläuft und möglicherweise caspasenunabhängig erfolgt. Dieser Hypothese ergänzend wurde im Rahmen einer *in vitro* durchgeführten *Helicobacter pylori*-Infektion ebenfalls eine caspasenunabhängige Zytokinsekretion beobachtet, während gleichzeitig subletale Apoptosesignale vorlagen (317). Im Falle der Kontrollzellen ist nach diesen subletalen Stimuli dennoch sowohl eine Caspase-3-Aktivierung als auch eine IL-6-Zytokinsekretion infolge der BH3-Mimetika-Behandlung erkennbar (Abbildung 9A, B). Daher könnte eine mögliche Erklärung für die bisherigen Daten darin bestehen, dass nachfolgend MOMP (Bax/Bak-abhängig) mitochondriale DNA (mtDNA) ins Zytoplasma freigesetzt wird. Diese freigesetzte mtDNA könnte dann über den cGAS/STING-Signalweg die Genexpression im Zellkern aktivieren und die Zytokinsekretion stimulieren (7, 326, 327). Im Detail könnte dies wie folgt ablaufen: cGAS kann im Zytosol an die mitochondriale DNA binden, was eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum von cGAS induziert. Dies wiederum katalysiert die Synthese von cGAMP aus ATP und GTP (328).

Das cGAMP-Isomer mit der Bezeichnung „2'3'-cGAMP" fungiert als Bote, der an STING bindet und mittels einer Konformationsänderung zur Aktivierung von STING beiträgt (328, 329). In Folge davon transloziert das aktivierte STING vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat. Während dieses Vorgangs rekrutiert und aktiviert der Carboxylterminus von STING die *TANK-binding kinase 1* (TBK1), die wiederum den Transkriptionsfaktor *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) phosphoryliert. Das phosphorylierte IRF3 dimerisiert und tritt anschließend in den Zellkern ein (330). STING aktiviert ebenfalls die Kinase IKK, die die I κ B-Familie von Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B phosphoryliert (331, 332). Ob eine STING-Stimulation in HeLa-Zellen für die Sekretion von IL-6 hinreichend ist, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Allerdings konnte im Rahmen einer *Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA)-Infektion eine Reduktion der IL-6-Sekretion beim Fehlen von STING sowie in Abwesenheit von mtDNA gezeigt werden ((8), Gradzka-Boberda *et al.*, unveröffentlicht). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass MVA vermutlich durch cGAS-STING als *pattern recognition receptor* (PRR) erkannt wird. Somit ist es wahrscheinlicher, dass MVA aufgrund des defekten PRR-Systems von der Zelle nicht erkannt wird und somit auch keine anti-virale Zellantwort (z.B. Sekretion von Zytokinen) ausgelöst werden kann. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob die eingesetzten subletalen Stimuli überhaupt in der Lage sind mitochondriale DNA freizusetzen. Die Frage, welcher Ligand für cGAS dabei generiert werden könnte, bleibt nach wie vor unbeantwortet.

Es ist jedoch auch möglich, dass im Zusammenhang eines CAD vermittelten DNA-Schadens dsDNA (z. B. Mikronuklei-DNA) im Zytoplasma vorliegt und möglicherweise über den cGas/STING-Signalweg zur IL-6-Sekretion führt. Wie bereits angesprochen wären somit mögliche Kandidaten als cGAS-Liganden Mikronuklei, die durch CAD-Aktivität entstehen können (333). Unsere Forschungsgruppe hat bereits gezeigt, dass CAD-Aktivierung im Kontext der subletalen Aktivierung des Apoptoseapparates das Entstehen von Mikronuklei bewirkt. Dies kann zudem als ein weiterer Marker für eine durch CAD induzierte genomische Instabilität interpretiert werden (3). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigt sich in den CAD-defizienten Zellen sowohl nach S63845- als auch ABT-737-Behandlung eine signifikant reduzierte IL-6-Sekretion gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 15B). Dem ergänzend wurden in unserer Arbeitsgruppe

ebenfalls reduzierte IL-6 und TNF mRNA-Spiegel in CAD-defizienten Zellen gemessen (Moeed *et. al*, unveröffentlicht). Somit spielt CAD auch eine entscheidende Rolle in der IL-6-Sekretion. Die Frage, die sich weiterhin stellt, ist, inwieweit bzw. wodurch eine CAD-Aktivierung erfolgt.

Daher wurden weitere Signalwege in die Studie eingeschlossen. Nach S63845-Behandlung und zusätzlicher RIPK1-Inhibition ist eine Reduktion der IL-6-Sekretion in den Kontrollzellen sowie den Bax- und Bak-einzel-defizienten Zellen zu messen (Abbildung 10C). Folglich könnte die IL-6-Sekretion nach der Blockade von Mcl-1 möglicherweise über die Aktivierung des subletalen Nekroptose-Signalwegs erfolgen. Eine potenzielle Verbindung beispielsweise zum Signalkomplex RIPK1/RIPK3 und cFlip könnte über Smac und nachfolgend cIAP1/2 bestehen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigt sich eine signifikante Erhöhung der IL-6-Sekretion in sowohl den Smac- als auch PARL-defizienten Zellen nach subletalen Stimuli im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 14B). Eine alternative Erklärung könnte also sein, dass in Abwesenheit von Smac keine Caspasenaktivierung erfolgt, die wiederum die IL-6-Sekretion limitieren könnte. Alternativ ist denkbar, dass in Abwesenheit von Smac bzw. der Blockade der Inhibierung von IAPs durch Smac cIAP1/2 nicht degradiert wird und somit an der Initiierung der Nekroptose im TNF-Rezeptorkomplex beteiligt sein könnten.

Um weitere plausible Erklärungen für die IL-6-Sekretion zu erhalten, wurden auch bedeutende Proteine des extrinsischen Apoptosesignalwegs in die Untersuchungen mit einbezogen. Caspase-8-defiziente HeLa-Zellen wurden für die weiteren BH3-Mimetika Behandlungen verwendet. Bemerkenswert ist, dass in diesen Zellen nach Mcl-1-Inhibition nahezu keine messbare IL-6-Sekretion auftritt (Abbildung 15B). Es stellt sich daher die Frage, inwieweit Caspase-8 eine Rolle in der IL-6-Sekretion spielt. Eine Verbindung zwischen Caspase-8 und den zellständigen Todesrezeptoren scheint eher unwahrscheinlich zu sein, da keine weiteren Hinweise darauf in der Literatur gefunden werden konnten. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass Caspase-8 sowohl nukleäre als auch mitochondriale Funktionen zugeschrieben werden. Es könnte daher sein, dass Caspase-8 an einem mitochondrialen Komplex beteiligt ist, der anschließend beispielsweise in die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs resultiert (334). Ergänzend dazu rückt ein weiterer potenzieller Signalweg in den Fokus: Der *mitochondrial antiviral*

signaling (MAVS)-Signalweg. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Caspase-3 nicht nur cGAS sondern auch MAVS aktivieren bzw. spalten kann (335). MAVS kann von den Caspasen an Aspartat 429 (D⁴²⁹) und Aspartat 490 (D⁴⁹⁰) gespalten werden (335, 336). Caspase-8 wiederum kann sowohl RIPK1 (337) als auch IRF3 (338) spalten. Eine mögliche Hypothese wäre deshalb, dass Caspase-8 mit MAVS einen Signalkomplex bildet (339). Nachfolgend einer Semliki-Forest-Virus (SFV) Infektion konnte bereits eine Interaktion von MAVS mit Caspase-8 an den Mitochondrien auf eine FADD und Bax/Bak-unabhängige Weise gezeigt werden. Dies geschah, indem Caspase-8 durch MAVS an die Mitochondrien rekrutiert wurde (339). In unserem vorliegenden Modell wäre allerdings ein MAVS-Stimulus erforderlich. Es ist vorstellbar, dass nach der BH3-Mimetika Behandlung dsRNA ins Zytoplasma freigesetzt wird, die dann von zytoplasmatischen RNA-Helikasen, dem Retinsäure-induzierbaren Gen-I (RIG-I) (340) und dem Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) (341) erkannt werden. MDA5 und RIG-I können den gemeinsamen Adapter MAVS nach Ligandenbindung aktivieren, der wiederum TBK1 und IKK-epsilon (IKK ϵ) rekrutieren und aktivieren kann (342). Mittels der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 dieser beiden Kinasen könnte die Zytokinsekretion - in dem Fall IL-6 - erfolgen.

Zusammenfassend legen die Versuchsergebnisse nahe, dass Caspase-8 im Rahmen der IL-6-Sekretion zusammen mit CAD eine entscheidende Rolle spielt.

2. Unterschiede zwischen den BH3-Mimetika ABT-737 und S63845

Im vorherigen Kapitel wurden bereits die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zytokinen ausführlich beschrieben und diskutiert. Die Balance zwischen pro- und anti-apoptischen Proteinen ist von entscheidender Bedeutung für die Regulierung und Durchführung des intrinsischen mitochondrialen Apoptosesignalwegs sind (343). Wie bereits erwähnt wurden in der vorliegenden Arbeit Substanzen eingesetzt, die die Funktion der anti-apoptischen Bcl-2-Proteine limitieren, bekannt als BH3-Mimetika. Um mögliche Unterschiede zwischen den anti-apoptischen Proteinen bzw. den beiden hier verwendeten BH3-Mimetika zu identifizieren, wurden HeLa-Zellen mit Defizienzen der jeweiligen

anti-apoptotischen Proteine (Mcl-1 und Bcl-X_L) behandelt. Eines der ersten klinisch zugelassenen BH3-Mimetika war ABT-263 (Navitoclax), eine oral verfügbare Form von ABT-737. Dieses BH3-Mimetikum inhibiert Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w (74, 344). Demgegenüber hemmt S63845 nur Mcl-1 (80). Es ist wichtig zu betonen, dass die anti-apoptotischen Proteine unterschiedliche Affinitäten zu Bax und Bak aufweisen. Zusätzlich zeigen die anti-apoptotischen Proteine funktionell verschiedene Spezifitäten in Bezug auf die Antagonisierung von Multidomänen-Proteinen. Beispielsweise wurde *in vivo* für Bak gezeigt, dass es von Bcl-X_L und Mcl-1, jedoch nicht von Bcl-2, gebunden wird (345).

Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass infolge der subletalen Aktivierung des Apoptosesignalwegs eine geringe Caspase-3-Aktivierung nachweisbar ist (3). Dies wurde entweder durch eine limitierte Porenbildung der Mitochondrien oder das Ausbleiben der Permeabilisierung mancher Mitochondrien erzielt (8, 71). Diesen Kenntnissen folgend ist in den Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen nach BH3-Mimetika-Behandlung lediglich eine geringe Aktivierung der Caspase-3 detektierbar (Abbildung 9A). Die Überexpression von Bcl-X_L führt zur Blockade des mitochondrialen Apoptosesignalwegs und somit zur Ausbleibenden Caspasenaktivierung. Des Weiteren wurde beobachtet, dass in Mcl-1-defizienten Zellen nach Behandlung mit ABT-737 die Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert ist. Im Kontrast dazu zeigt eine Deletion von Bcl-X_L nach S63845-Behandlung einen ähnlichen Anteil an Caspase-3-positiven Zellen wie die Kontrollzellen (Abbildung 9A). Dieser Effekt ist nicht unerwartet, da eine gemeinsame Inhibition von Bcl-X_L und Mcl-1 einen starken pro-apoptotischen Effekt (Aktivierung der Caspasen) bewirkt (346). Überraschenderweise wurde in der durchflusszytometrischen Färbung in beiden unstimulierten einzel-defizienten Zelllinien (defizient für Bcl-X_L oder Mcl-1) tendenziell eine höhere Anzahl aktiver Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen. Dieser Befund legt nahe, dass die Defizienz von Bcl-X_L oder Mcl-1 bereits zu einer geringen Aktivierung des Apoptoseapparates und somit der Caspase-3 führt.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigt sich auch bezüglich der IL-6-Sekretion, dass die Defizienz der anti-apoptotischen Proteine, welcher Mechanismus auch immer verantwortlich ist, bereits eine geringgradige Aktivierung des Apoptosesignalwegs ermöglicht. In Zellen mit einer Mcl-1

Defizienz ist bereits im nicht-stimulierten Zustand eine relativ hohe Menge an IL-6 messbar und nach BH3-Mimetika Behandlung ist keine weitere Induktion der Zytokinsekretion erkennbar (Abbildung 9B). Ähnliches ist in den Bcl-X_L-defizienten Zellen zu beobachten, allerdings auf einem niedrigeren Niveau. Außerdem ist nach der zusätzlichen Caspaseninhibition (+BH3-Mimetika) in den einzel-defizienten Zelllinien keine Reduktion, sondern im Gegenteil, eine Erhöhung der IL-6-Sekretion detektierbar. Der Effekt der hier beobachteten Caspaseninhibition ist höchstwahrscheinlich derselbe, der bereits für die Apoptose beobachtet wurde (71). Es bleibt jedoch unklar, warum die IL-6-Sekretion nach der Inhibition oder Defizienz einzelner anti-apoptotischer Proteine erst nach Blockade aller Caspasen sichtbar wird. Giampazolis *et al.* haben beispielsweise gezeigt, dass MOMP unter Caspase-defizienten Bedingungen effektiv den NF-κB-Signalweg aktivieren kann, was wiederum zur Expression von pro-inflammatorischem TNF führt (9). In diesem Zusammenhang könnte nach der Blockade aller Caspasen der inhibierende Effekt auf den NF-κB-Signalweg aufgehoben werden, was zu einer erhöhten Zytokinsekretion führen könnte.

Trotz einer gemessenen Caspase-3-Aktivierung nach BH3-Mimetika Behandlung und zusätzlicher Blockade einzelner anti-apoptotischer Proteine, wurde in den einzel-defizienten Zelllinien nahezu keine Sekretion von IL-8 oder CXCL-1 festgestellt (Abbildung 9C, D). Es wird vermutet, dass eventuell diese starken pro-apoptotischen Stimuli zu einer verstärkten Caspasenaktivierung und daher Blockade der Zytokinsekretion führen (8). In dem vorliegenden Zusammenhang, in dem ein mitochondriales pro-apoptotisches Signal als Auslöser fungiert, könnte das beschriebene Szenario nur durch einen *feedback-loop* oder eine mögliche Verbindung zu Smac/cIAPs erklärt werden. Dies ist bislang rein spekulativ und müsste experimentell weiter untersucht werden.

Um weitere Erklärungen für all diese aufgeworfenen Fragen zu finden, könnten in diesem Szenario auch die BH3-only-Proteine eine nicht minder untergeordnete Rolle spielen. Morales *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass in Zellen aus multiplen Myelomen der endogene Proteinspiegel von Noxa eine Rolle bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber ABT-737 spielen kann. Andererseits wurde auch nachgewiesen, dass keines der BH3-Proteine, die als direkte Aktivatoren fungieren, für die Bax/Bak-Aktivierung notwendig ist, sobald Bcl-X_L/Mcl-1 neutralisiert wurden (347). Es ist wichtig zu erwähnen, dass Noxa und Bim direkte Gegenspieler

von Mcl-1 sind. Daher könnte in weiteren Experimenten eine Messung der Level an BH3-only-Proteinen nach subletalen Stimuli erfolgen. In den Kontrollzellen ist nach S63845-Behandlung im Gegensatz zur ABT-737-Behandlung eine deutlich höhere IL-8/CXCL-1-Sekretion messbar. Dies wirft die Frage auf, was ursächlich für diese unterschiedlich gemessenen Zytokinlevel sein könnte. Eine Überlegung wäre, dass nachfolgend der beiden BH3-Mimetika Behandlung unterschiedliche Mengen an Cytochrom *c* oder Smac aus den Mitochondrien freigesetzt werden, was zu einer unterschiedlich starken Aktivierung der Caspasen führen könnte. Diese Hypothese müsste in weiteren Untersuchungen, wie zum Beispiel mittels konfokaler Mikroskopie, näher untersucht werden. Erneut sind deutliche Unterschiede bezüglich der IL-8 und IL-6-Sekretion detektierbar. Im Hinblick auf die IL-8- und CXCL-1-Sekretion sind keine Unterschiede zwischen den Mcl-1- und Bcl-X_L-defizienten Zellen erkennbar.

3. Unterschiede zwischen den pro-apoptischen Proteinen Bax und Bak

Angesichts der unterschiedlichen Effekte, insbesondere in Bezug auf die Zytokinsekretion, zwischen den anti-apoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern, ist es angebracht, auch die beiden pro-apoptischen, porenbildenden Bcl-2-Proteine Bax und Bak genauer zu analysieren. Eine entscheidende Frage ist unter anderem, ob diese beiden Proteine eine direkte Rolle in Bezug auf die IL-6-Sekretion spielen. Die durchflusszytometrischen Messungen zeigen, dass Zellen, die ausschließlich Bak enthalten, ähnlich den doppelt-defizienten Zellen, nach subletalen Stimuli (S63845 oder ABT-737) vor dem Zelltod geschützt sind (nahezu keine Caspase-3-Aktivierung) (Abbildung 10A). Im Gegensatz dazu zeigt sich in Zellen mit nur Bax eine Caspase-3-Aktivierung, die mit den Kontrollzellen vergleichbar ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Caspasenaktivität – und damit vermutlich die Freisetzung mitochondrialer Proteine – von Bax, jedoch nicht von Bak, abhängig ist. Demnach reicht Bax für den mitochondrialen äußeren Membranpermeabilisierungsprozess und somit für die Caspasenaktivierung aus.

Wie bereits erörtert, bleibt unklar, inwieweit die Funktionen von Bax und Bak tatsächlich redundant sind. Es wurden viele Situationen beschrieben, in denen eines

der beiden Proteine wichtiger war als das andere (siehe Einleitung). Auf molekularer Ebene zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen Bax und Bak. Zum Beispiel ist bekannt, dass Mcl-1 der Hauptinhibitor von Bak, aber nicht von Bax ist (76, 345). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Bax-abhängige und Bak-unabhängige Aktivierung der Apoptose nach ektopter Harakiri (Hrk)-Expression in HCT-116-Zellen erfolgte (348, 349). Sowohl in den Bax- als auch Bak-einzeldefizienten Zellen ist nach S63845-Behandlung eine signifikant reduzierte Zytokinsekretion gegenüber den Kontrollzellen messbar (Abbildung 10C, E, G). Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da sie offenbar die Induktion von Apoptose von der Generierung subletaler, Zytokin-auslösender Signalwege trennt. Die exakten molekularen Mechanismen hinter dieser Beobachtung sind jedoch derzeit noch unklar. Nach allem, was derzeit bekannt ist, folgen sowohl letale als auch subletale Signale denselben Signalwegen. Möglicherweise liegt die Erklärung für diese Beobachtung in einer unterschiedlichen Kinetik, und somit in einer unterschiedlichen Erreichung von Signalschwellen für die Apoptose.

Bei genauerer Betrachtung der Kinetik konnte gezeigt werden, dass die proapoptischen Proteine in verschiedenen Zeitintervallen die Induktion der Zytokinsekretion beeinflussen können (Abbildung 11). Sowohl in den Bax-defizienten als auch den Kontrollzellen erfolgt die Zytokinsekretion zu einem deutlich späteren Zeitpunkt im Vergleich zu den doppelt-defizienten Zellen. Erklärungen für diese Beobachtungen können derzeit nicht erfolgen.

Überraschenderweise wurde in den Bax-defizienten Zellen lediglich nach Blockade von Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w eine signifikant höhere Sekretion von IL-6, IL-8 und CXCL-1 im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen. Somit erfolgt die Zytokinsekretion nach ABT-737-Behandlung beim alleinigen Vorliegen von Bak vermutlich Apoptoseunabhängig. Weiter scheint die alleinige Aktivierung von Bax die Zytokinsekretion zu unterdrücken. Denn in den Bak-defizienten Zellen wurde sowohl nach S63845 als auch ABT-737-Behandlung eine signifikant reduzierte Zytokinsekretion gegenüber den Kontrollzellen gemessen. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Aktivierung von Bak zur subletalen Aktivierung des Apoptosesignalwegs führt, während die Aktivierung von Bax zur letalen Apoptose führt. Weiterführend könnte eine detaillierte Analyse der Smac bzw. Cytochrom *c* Freisetzung in den einzel-defizienten Zellen während der Behandlung mit den unterschiedlichen pro-apoptischen Stimuli sinnvoll sein.

4. Involvierung weiterer Signalwege in die Zytokinsekretion

4.1. Der NF- κ B-Signalweg spielt auf Transkriptionsebene keine nachweisbare Rolle für die IL-6-Sekretion nachfolgend subletaler Stimuli

Weiterführend sollen auch auf Transkriptionsebene weitere Signalwege näher analysiert werden, die möglicherweise eine Rolle für die Zytokinsekretion spielen. Hierbei ist beispielsweise der NF- κ B Signalweg zu nennen (350). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von *Smac-Mimetics* in die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen mittels der Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs resultiert (313). Weder in den Kontrollzellen noch in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen konnte durchflusszytometrisch eine Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs nach BH3-Mimetika Behandlung gemessen werden (Abbildung 13A). Auch nach Hinzuziehung einer Western Blot Analyse wurde nach den subletalen Stimuli in den Bax- sowie Bak-einzel-defizienten Zellen kein Unterschied bezüglich des p-p65-Signal detektiert (Abbildung 13C). Aufgrund dessen, dass nach ABT-737-Behandlung zwischen den einzel-defizienten Zelllinien deutliche Unterschiede bezüglich der Zytokinspiegel observiert wurden, liefert dieser Signalweg offenbar keine Erklärung. Denn im Gegensatz zur vermehrten Zytokinsekretion in den Bax-defizienten Zellen nach ABT-737-Behandlung ist in diesen Zellen keine stärkere Phosphorylierung von p65 messbar. Eine nähere Betrachtung der Aktivierung des alternativen Signalwegs könnte möglicherweise weitere Anhaltspunkte liefern. Es ist ebenso anzumerken, dass die gewählten Methoden möglicherweise nicht sensitiv genug sind, da bereits in der Literatur gezeigt werden konnte, dass NF- κ B, JNK oder ATF4 auf Transkriptionsebene die Freisetzung von IL-8 unterstützen können (351, 352).

4.2. Bax/Bak-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen nach S63845-Behandlung

Ergänzend zum NF- κ B-Signalweg spielen auf Transkriptionsebene auch die MAP-Kinasen eine wesentliche Rolle bei der Zytokinsekretion. Um die Phosphorylierung der MAP-Kinasen auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Zur Bewertung der Aktivierung der MAP-Kinasen im Zusammenhang mit der Apoptose bzw. der subletalen Aktivierung des Apoptosesystems wurde γ H2AX als indirekter Marker für entstandene DNA-Schäden verwendet (100). In den Kontroll- sowie Bax- und Bak-einzel-defizienten Zellen zeigt sich nach der Behandlung mit den entsprechenden BH3-Mimetika (S63845 oder ABT-737) eine DNA-Schadensantwort, die durch die Detektion von γ H2AX als Marker veranschaulicht wird. Diese DNA-Schadensantwort könnte infolge der CAD-Aktivierung erfolgen, die selbst durch Caspasenaktivierung mittels Smac und Cytochrom *c* vermittelt wird. Die Beobachtungen bezüglich der Caspase-3-Aktivierung (siehe Kapitel IV 1.2) legen nahe, dass bereits eines der beiden pro-apoptotischen Proteine (Bax oder Bak) ausreicht, um MOMP und somit einen CAD-vermittelten DNA-Schaden zu induzieren. Dieser Hypothese folgend kann in den jeweiligen einzel-defizienten Zelllinien nach BH3-Mimetika Behandlung γ H2AX detektiert werden (Abbildung 12A-C). Im Gegensatz dazu konnte wie erwartet infolge des Ausbleibens von MOMP (Bax/Bak-doppel-Defizienz) kein γ H2AX-Signal gemessen werden aufgrund der fehlenden Caspasen- und CAD-Aktivierung.

Vor dem Hintergrund der gemessenen DNA-Schadensantwort wurde in ebendiesen Zelllinien die Aktivierung der drei MAP-Kinasen (Phosphorylierung von ERK, JNK oder p38) untersucht (Abbildung 12D-L). Nach den subletalen pro-apoptotischen Stimuli (S63845 oder ABT-737) sind weder zwischen den einzel-defizienten Zelllinien noch gegenüber den Kontrollzellen Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung der drei MAP-Kinasen erkennbar. Möglicherweise ist die Aktivierung der MAP-Kinasen von der Anwesenheit von zumindest einem der beiden pro-apoptotischen Proteine, Bax oder Bak, abhängig, jedoch offensichtlich unabhängig vom Apoptoseweg (da die Caspase-3-Aktivierung nur Bax-abhängig ist). Allerdings ist an dieser Stelle zu bedenken, dass bezüglich der Caspase-3-Aktivierung (Kapitel IV 1.2) durchaus Unterschiede zwischen den einzel-defizienten Zellen festgestellt wurden. Daher sollten die oben genannten

Überlegungen bezüglich der Aktivierung der MAP-Kinasen vorsichtig interpretiert werden. In bisher unveröffentlichten Daten aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von CAD zur Anregung der proinflammatorischen Signalwege, einschließlich der Phosphorylierung der Kinasen JNK, p38 und ERK, führt (Thilmany *et al.*, unveröffentlicht). Diesen Ergebnissen folgend ist nach S63845-Behandlung in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen (Ausbleiben von MOMP) keine Phosphorylierung von ERK, JNK oder p38 detektierbar.

Wie bereits im Kapitel IV 1.4 angedeutet sind auch bezüglich der Aktivierung der MAP-Kinasen Unterschiede zwischen den hier eingesetzten BH3-Mimetika detektierbar. Nach ABT-737-Behandlung erfolgt anscheinend die MAP-Kinasen-Aktivierung Bax/Bak unabhängig. Eine plausible Erklärung kann dafür nicht gegeben werden. Möglicherweise könnten die Beobachtungen auf das BH3-Mimetikum ABT-737 und unspezifische Effekte zurückzuführen sein (71). Die Aktivierung der MAP-Kinasen nach ABT-737-Behandlung kann nicht in Verbindung zu den Zytokinsekretionsdaten gesetzt werden, da zwischen den einzeldefizienten Zelllinien keine nennenswerte Unterschiede detektierbar sind. Weiter existieren zwischen den BH3-Mimetika auch Unterschiede in Bezug auf die zeitliche Dynamik der MAP-Kinasen-Aktivierung. Dies könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Mcl-1 im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie eine erheblich kürzere Halbwertszeit aufweist und somit schneller wieder von aktivierten Caspasen gespalten werden kann (353). Diese Unterschiede in der Stabilität von Mcl-1 könnten eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der MAPK-Signalkaskade und der Reaktion auf die verschiedenen Behandlungen spielen. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen bereits nach einer 5-stündigen S63845-Behandlung nachweisbar sind.

Weiterführend könnte experimentell die Aktivierung der MAP-Kinasen in Zelllinien mit Defizienzen der jeweiligen anti-apoptotischen Proteine näher analysiert werden, um Antworten auf die Unterschiede bezüglich der beiden Inhibitoren zu erhalten. Welcher Signalweg auf Transkriptionsebene eine Rolle für die Zytokinsekretion spielt bleibt weiter unklar.

5. Verbindung zwischen subletaler Aktivierung des Apoptosesystems und dem Immunsystem im Rahmen von Infektionsmodellen

5.1. Bax/Bak-unabhängige Zytokinsekretion nach Infektion mit *Salmonella Typhimurium*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass unterschiedliche Pathogene die Sekretion von Zytokinen wie IL-6 oder IL-8 aus infizierten HeLa-Zellen induzierten. In den meisten Fällen war die Zytokinsekretion von einem funktionierenden mitochondrialen Apoptoseapparat abhängig. Dies wurde durch reduzierte Zytokinspiegel in den Bax/Bak-doppelt-defizienten oder Bcl-X_L-überexprimierenden HeLa-Zellen gezeigt (8). Um die Rolle der subletalen Apoptose für die Zytokinsekretion infolge einer Infektion besser zu verstehen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit HeLa-Zellen mit dem fakultativ intrazellulären Pathogen *Salmonella Typhimurium* infiziert.

Nach einer 24-stündigen Salmonelleninfektion zeigt sich, dass in allen Zellen mit einer Defizienz der caspase-aktivierenden bzw. assoziierten Proteine (Smac, PARL, Apaf-1 und Caspase-9) eine den Kontrollzellen vergleichbare IL-6-, IL-8- und CXCL-1-Sekretion feststellbar ist (Abbildung 16A-C). Diese Beobachtung legt nahe, dass das Fehlen dieser spezifischen Proteine die Freisetzung entzündlicher Zytokine nicht beeinträchtigt. Um die Rolle der Mitochondrien in der pathogenabhängigen Zytokinsekretion weiter zu klären, wurden auch Bax/Bak-doppelt-defiziente Zellen mit *S. Typhimurium* infiziert. Wie bereits zuvor von Brokatzky *et al.* hatten gezeigt, dass in diesen doppelt-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion der Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den Kontrollzellen zu finden ist (8). Somit erfolgte in dem vorliegenden publizierten Fall die Zytokinsekretion offenbar mitochondrienabhängig. In den Experimenten in diesem Projekt fanden wir hingegen, dass in den vorliegenden Experimenten in den Bax/Bak-doppelt-defizienten Zellen eine signifikant erhöhte Zytokinsekretion gegenüber den Kontrollzellen detektierbar ist (Abbildung 16A-C). Die Zytokindaten legen nahe, dass die Sekretion unabhängig von Bax und Bak erfolgt, und somit der Beitrag des mitochondrialen Apoptosesignalwegs wahrscheinlich gering ist. Es ist anzumerken, dass mögliche Ursachen für diese gegenläufigen Beobachtungen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der Bakterien oder

genetischen Variationen einzelner Bakterien liegen könnten. Die genauen Infektionsbedingungen scheinen von entscheidender Bedeutung zu sein. In vorangegangenen Studien wurde nach einer *in vitro* Infektion mit *Toxoplasma gondii* oder MVA eine signifikante Reduktion der Zytokinsekretion in Zellen, die sowohl Bax als auch Bak nicht exprimierten, festgestellt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Zytokinsekretion nach einer Influenza (IAV)-Infektion arbeitsgruppenintern ebenfalls unabhängig von Bax und Bak (Brokatzky *et al.*, unveröffentlicht). All diese Beobachtungen sind besonders interessant, da sie in Verbindung mit Literaturdaten darauf hindeuten, dass die Zytokinsekretion je nach Pathogen über unterschiedliche Signalwege erfolgt.

Aufgrund dessen, dass Brokatzky *et al.* eine CAD-abhängige DNA-Schadensantwort im Rahmen der Salmonelleninfektion zeigen konnten (8), stellt sich die Frage, ob CAD auch eine Rolle in der pathogenassoziierten Zytokinsekretion spielt. Daher wurden CAD-defiziente Zellen ebenfalls mit *S. Typhimurium* infiziert. In diesen Zellen ist eine signifikant reduzierte IL-6-Sekretion gegenüber den Kontrollzellen beobachtbar (Abbildung 16D). Somit scheint CAD im Rahmen dieser Salmonelleninfektion eine entscheidende Rolle für die Zytokinsekretion zu spielen. Möglicherweise könnte die gemessene Zytokinsekretion erneut über den cGAS/STING-Signalweg induziert werden. Dies könnte mittels freigesetzter mitochondrialer und/oder nukleärer DNA ins Zytosol erfolgen. Weiter stellt sich nun die Frage, über welchen Signalweg es zu einer CAD-Aktivierung kommt und welcher Signalweg genau eine Rolle für die infektionsabhängige Zytokinsekretion spielt. Dabei ist anzumerken, dass die CAD-Aktivierung nicht nur über den mitochondrialen Apoptosesignalweg vermittelt werden kann. Vielmehr könnten in weiteren Experimenten auch der extrinsische Signalweg (beispielsweise Caspase-8) einbezogen werden. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die genauen Zusammenhänge dieses alternativen Weges besser zu verstehen. Auch im Rahmen einer HSV-1 und IAV-Infektion konnte ein CAD-abhängiger DNA-Schaden observiert und somit eine Beteiligung CADs gezeigt werden (8). Für die IL-8 und CXCL-1-Sekretion ist hingegen keine CAD-Abhängigkeit zu beobachten. Dies veranschaulicht erneut die Unterschiede zwischen der IL-8 und IL-6-Sekretion. Weitere experimentelle Arbeiten sind für das Verständnis bezüglich der pathogenassoziierten Zytokinsekretion notwendig. Beispielsweise konnten Naseer *et al.* zeigen, dass Caspase-4 für die Aktivierung

des Inflammasoms in Caco-2-Zellen als Reaktion auf eine Salmonelleninfektion notwendig ist und nachfolgend der Inflammasomaktivierung eine Zytokinsekretion erfolgt (354). Somit könnten möglicherweise auch weitere Caspasen eine Rolle in der Zytokinsekretion spielen.

5.2. Smac-abhängige Immunzellrekrutierung während *C. muridarum* Infektion

Eine erfolgreiche Bekämpfung einer Chlamydieninfektion erfordert das Zusammenspiel von Immunzellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Besonders T-Zellen und Neutrophile haben sich als entscheidend für die Bekämpfung einer Chlamydien-FGT-Infektion erwiesen (304). Bisher ist noch nicht geklärt, inwieweit Proteine des Apoptosesignalwegs *in vivo* eine Rolle in der Aktivierung des Immunsystems vor dem Hintergrund einer Chlamydieninfektion spielen. Allerdings konnte im Rahmen einer *in vitro* erfolgten *Chlamydia trachomatis* Infektion bereits gezeigt werden, dass die IL-6-Sekretion in Zellen mit einer STING- oder CAD-Defizienz sowie einer Bax/Bak-doppel-Defizienz deutlich reduziert ist. Somit könnte sowohl mtDNA als auch ein CAD-abhängiger DNA-Schaden zur Zytokinsekretion führen. Diese Daten deuten darauf hin, dass subletale Signale und die damit verbundene Zellstimulation im Rahmen einer Chlamydieninfektion zur Sekretion von Zytokinen und der Auslösung von Entzündungen beitragen könnten (8). Da Dörflinger *et al.* bereits zeigen konnten, dass Smac eine wichtige Rolle in der Zytokinsekretion im Rahmen einer *in vitro* erfolgten *Helicobacter pylori* Infektion spielt (317), stellt sich nun die Frage, ob Smac auch während einer *in vivo* erfolgten Chlamydieninfektion eine Rolle in der Chemokinexpression spielt und eine Smac-abhängige Immunaktivierung erkennbar ist.

Ein geeignetes Mausmodell für eine Chlamydieninfektion stellt die intravaginale Infektion mit *Chlamydia muridarum* dar. Die genitale, murine Chlamydieninfektion beginnt mit der Infektion des zervikalen Epithelgewebes. Nach der erfolgten Infektion breitet sich die Infektion in den ersten Tagen in die oberen Abschnitte des Genitaltrakts aus, da die Chlamydien aufsteigen. Dabei dauert es nicht lange, bis die ersten Immunzellen in das infizierte Gewebe

einwandern. Die Abwehrmechanismen des Immunsystems spielen eine entscheidende Rolle bei der Eindämmung der Infektion und sind essenziell für die erfolgreiche Bekämpfung von Chlamydien im Körper (304). Unter optimalen Laborbedingungen konnten Barth *et al.* zeigen, dass im vaginalen Infektionsmodell bereits nach 1-2 Tagen p.i. in Wildtyp (WT)-Mäusen (C57BL/6 Laborhintergrund) chlamydiale Genomkopien im oberen Genitaltrakt nachweisbar waren (355). Mäuse können die Chlamydieninfektion innerhalb von 3 bis 4 Wochen beseitigen (356). Nach 4-tägiger *C. muridarum* Infektion ist in den Smac-defizienten Mäusen gegenüber den heterozygoten Mäusen eine deutlich reduzierte Anzahl an myeloiden, NK-, ILC-1-, sowie T-Zellen in den Uterushörnern beobachtbar (Abbildung 18). Im Gegensatz dazu wurde im oberen Genitaltrakt (Ovidukt + Ovar) in den Smac-defizienten Mäusen bereits 4 Tage p.i. eine deutlich höhere Anzahl an Immunzellen als in den heterozygoten Mäusen beobachtet. Eine Erklärung könnte sein, dass die Chlamydien in Abwesenheit von Smac schneller in die oberen Genitaltraktabschnitte aufsteigen können. Diesem Effekt könnte beispielsweise eine ausbleibende Immunzellrekrutierung zugrunde liegen. Um dies weiter zu überprüfen, wurden einzelne für die Immunzellrekrutierung wichtige Chemokine näher betrachtet. Tatsächlich ist in den Smac-defizienten Mäusen 24 h p.i. kaum eine Chemokinexpression von CXCL-1, CXCL-5, CXCL-10, CCL-2, CCL-4 und CCL-7 im Gegensatz zu den WT-Mäusen nachweisbar (Abbildung 20). Diese Reduktion der Chemokinexpression könnte somit zu einer deutlich verringerten Infiltration der Immunzellen in das Entzündungsgebiet in den unteren Genitaltraktabschnitten führen, was das schnellere Aufsteigen der Chlamydien erklären könnte. Bereits nach 24-stündiger Infektion ist eine nicht-signifikant höhere Menge an chlamydialen Genomkopien in der Ektozervix in den Smac-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen nachweisbar (Abbildung 21A). Dies deutet darauf hin, dass sich die Bakterien in Abwesenheit von Smac schneller vermehren. Bereits nach einer 4-tägigen Infektion ist dieser Unterschied zwischen den beiden Genotypen signifikant.

All diese Beobachtungen legen nahe, dass Smac eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems und somit bei der Bekämpfung von Chlamydien spielt. Einzelne Proteine des Apoptosesignalwegs scheinen dabei eine wesentliche Funktion in der Chemokinexpression zu haben. Möglicherweise können sich die Chlamydien ohne Smac schneller in den Zellen replizieren und dadurch weitere

Zellen infizieren. Eine plausible Erklärung hierfür könnte sein, dass die Abwesenheit von Smac und die ausbleibende Hemmung von cIAP1/2 zu einer Reduktion der Stabilisierung von NIK führen, was wiederum die Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs und die nachfolgende Expression der Chemokin-Gene beeinträchtigt (317). Dass Chemokine, allen voran das pro-inflammatorische Zytokin IL-6, eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der Chlamydieninfektion spielt, konnte bereits *in vivo* gezeigt werden. Denn IL-6-defiziente Mäuse konnten eine genitale Chlamydieninfektion nicht effektiv beseitigen (357). Es stellt sich zwangsläufig die Frage, ob diese Funktion von Smac pathogenspezifisch ist oder nicht.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass Smac eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des Immunsystems im Rahmen einer Chlamydieninfektion spielt und weitere Forschung auf diesem Gebiet dringend erforderlich ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltods: Die Zelle stirbt durch Aktivierung eines spezifischen Signaltransduktionswegs. Im Jahr 2015 wurde eine subletale Aktivierung dieses Signalwegs beschrieben. Diese subletale Aktivierung ist mit einer limitierten Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und einer reduzierten Caspasenaktivierung assoziiert. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass subletale Signale im mitochondrialen Apoptosesignalweg entzündliche Aktivität haben können. Im Gegensatz zur Apoptose ist die subletale Form immunologisch aktiv, da die Zellen Zytokine sezernieren können. Diese Botenmoleküle spielen eine Rolle bei der Immunaktivierung, indem sie beispielsweise Neutrophile rekrutieren oder die Kapillardurchlässigkeit erhöhen.

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit ist es, die Rolle einzelner am Apoptosesignalweg beteiligter Proteine bezüglich Zytokin-/Chemokinsekretion und Caspase-3-Aktivierung besser zu verstehen. Der mitochondriale Apoptosesignalweg hängt von einem Gleichgewicht der pro- (z. B. Bax, Bak) und anti-apoptischen Proteine (z. B. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) ab. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden *in vitro* HeLa-Zellen, die jeweils defizient für einzelne Apoptose-assoziierte Proteine (Smac, Apaf-1, PARL, XIAP, Caspase-8, Caspase-9) mit Bcl-2-Familien-Inhibitoren (BH3-Mimetika, S63845 und ABT-737) behandelt. Diese Inhibitoren hemmen spezifisch einzelne anti-apoptische Proteine und dienen der Erzeugung subletaler mitochondrialer pro-apoptischer Stimuli. Die Ergebnisse zeigen, dass die Chemokinsekretion (IL-8- und CXCL-1) nach Mcl-1-Inhibition (S63844) Caspasen- und CAD-abhängig erfolgt. Im Rahmen dieser ersten Experimente zeigten sich auch Unterschiede zwischen den hier eingesetzten BH3-Mimetika. Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit auch die anti- und pro-apoptischen Proteine näher charakterisiert. Bisher wurde angenommen, dass die pro-apoptischen Bcl-2-Effektorproteine Bax und Bak funktionell redundante Aufgaben erfüllen. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Caspasenaktivität – und womöglich die Freisetzung mitochondrialer Proteine - abhängig von Bax aber nicht von Bak ist, dass also Bax für MOMP und somit für die Caspasenaktivierung ausreicht. Außerdem konnte beim alleinigen Vorliegen von Bak (Bax-defiziente Zellen) eine apoptoseunabhängige IL-6-Sekretion gemessen werden. Dem ergänzend ist eine unterschiedliche Erreichung

der Signalschwellen für die Zytokinsekretion zwischen den einzelnen mitochondrialen Proteinen erkennbar. Die Zytokinsekretion erfolgte bei Vorliegen von Bak zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (> 54 h).

Darüber hinaus gibt es Daten, dass auch Infektionen eine subletale Aktivierung des Apoptosesignalwegs vermitteln können. Für einige Pathogene konnte bereits eine subletale Aktivierung des Apoptosesystems nachgewiesen werden. Die Aktivierung der subletalen Signalkaskade kann als zellautonome Abwehr- und Schutzstrategie gewertet werden. An *Salmonella* Typhimurium infizierter HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass im vorliegenden Infektionsmodell der mitochondriale, intrinsische Apoptosesignalweg eine eher untergeordnete Rolle bezüglich der pathogen-assoziierten Zytokinsekretion übernimmt.

Da das Apoptose-assoziierte mitochondriale Protein Smac nicht nur eine Rolle für die Caspasenaktivierung übernimmt, sondern auch in weiteren Signalwegen wie insbesondere dem NF- κ B-Signalweg involviert ist, wurden im abschließenden Teil der Arbeit Smac-defiziente Mäuse für ein Infektionsmodell verwendet. Die Ergebnisse dieses murinen *in vivo* Modells zeigen, dass nach einer *Chlamydia muridarum* Infektion im unteren Genitaltraktabschnitt der Smac-defizienten Mäuse sowohl eine reduzierte Immunzellinfiltration (reduzierte absolute Zahlen an NK-, T-Zellen, Neutrophile und weiteren myeloiden Zellen) als auch eine reduzierte Chemokinexpression (CXCL-1, CXCL-10, CXCL-5, CCL-2, CCL-4 und CCL-7) gegenüber den Kontrollmäusen gemessen werden kann. Demgegenüber wurde nach gleicher Infektionsdauer im oberen Genitaltrakt der Smac-defizienten Mäuse eine höhere absolute Anzahl an Immunzellen als bei den Kontrollmäusen gemessen. Diese Befunde lassen vermuten, dass in Abwesenheit von Smac die Chlamydien aufgrund der ausbleibenden Immunzellrekrutierung schneller aufsteigen können. Weiterhin wurde in den Smac-defizienten Mäusen eine höhere Anzahl chlamydialer Genomkopien im Vergleich zu den Kontrollmäusen gemessen. Somit scheint Smac eine entscheidende Rolle bezüglich der Aktivierung des Immunsystems zu übernehmen.

VII. SUMMARY

Apoptosis is a form of regulated cell death: The cell dies because of the activation of a specific signal transduction pathway. In 2015, a sub-lethal activation of this pathway was described. This sub-lethal activation is associated with a limited permeabilization of the outer mitochondrial membrane and a reduced caspase activation. Further studies have shown that sub-lethal signals in the mitochondrial apoptosis pathway can have an inflammatory activity. Unlike the ordinary apoptosis, the sub-lethal form is immunologically active as the cells can secrete cytokines. These messenger molecules play a role in immune activation by, for instance, recruiting neutrophils or increasing the capillary permeability.

The goal of the first part of the study is to better understand the role of individual proteins which are involved in the apoptotic signaling pathway regarding cytokine/chemokine secretion and caspase-3 activation. The mitochondrial apoptotic pathway depends on a balance of pro- (e.g., Bax, Bak) and antiapoptotic proteins (e.g., Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1). In the first part of this work, deficient *in vitro* HeLa-cells for individual apoptosis-associated proteins (Smac, Apaf-1, PARL, XIAP, Caspase-8, Caspase-9) were treated with Bcl-2 family inhibitors (BH3 mimetics, S63845, and ABT-737). These inhibitors specifically inhibit individual anti-apoptotic proteins and are used to generate sublethal mitochondrial pro-apoptotic stimuli. The results show that chemokine secretion (IL-8 and CXCL-1) following Mcl-1 inhibition (S63845) happens in a caspase- and CAD-dependent manner. Differences between the BH3 mimetics used in this study also emerged during these initial experiments. Hence, in the subsequent parts of the work, the anti- and proapoptotic proteins were further characterized. It has been previously assumed that the pro-apoptotic Bcl-2 effector proteins Bax and Bak fulfill functionally redundant roles. However, the results suggest that caspase activity - and possibly the release of mitochondrial proteins - is dependent on Bax but not on Bak which indicates that Bax is sufficient for MOMP and thus caspase activation. Furthermore, in cells solely expressing Bak (Bax-deficient cells), an apoptosis-independent IL-6 secretion was measured. Additionally, a different realization of signal thresholds for cytokine secretion among the individual mitochondrial proteins is recognizable. In the presence of Bak, the cytokine secretion occurs at a significantly later time point (> 54 h).

Furthermore, data has shown that infections can also lead to the sublethal activation of the apoptotic signaling pathway. Sublethal activation of the apoptosis system has already been observed for some pathogens. The activation of the sub-lethal signaling cascade can be considered as a cell-autonomous defense and protection strategy. In HeLa-cells infected with *Salmonella* Typhimurium, it has been shown that the mitochondrial intrinsic apoptotic signaling pathway plays a rather secondary role in this infection model when it comes to pathogen-associated cytokine secretion.

Since the apoptosis-associated mitochondrial protein Smac not only plays a role in caspase activation but is also involved in other signaling pathways, especially the NF- κ B signaling pathway, Smac-deficient mice were used in the final part of this work for an infection model. The results of this murine *in vivo* model show that after *Chlamydia muridarum* infection in the lower genital tract of Smac-deficient mice, both reduced immune cell infiltration (reduced absolute numbers of NK cells, T cells, neutrophils, and other myeloid cells) and reduced chemokine expression (CXCL-1, CXCL-10, CXCL-5, CCL-2, CCL-4, and CCL-7) can be measured compared to the control mice. On the other hand, after the same duration of infection in the upper genital tract of Smac-deficient mice, a higher absolute number of immune cells was measured compared to the control mice. These results suggest that in the absence of Smac, chlamydiae may ascend faster due to the lack of immune cell recruitment. Furthermore, a higher number of chlamydial genome copies were measured in the Smac-deficient mice compared to the control mice. Thus, Smac appears to play a crucial role in activating the immune system.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
2. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:367-401.
3. Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, Muthalagu N, Giampazolias E, Delgado ME, et al. Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol Cell*. 2015;57(5):860-72.
4. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*. 2000;2(3):156-62.
5. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(9).
6. White MJ, McArthur K, Metcalf D, Lane RM, Cambier JC, Herold MJ, et al. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*. 2014;159(7):1549-62.
7. Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*. 2014;159(7):1563-77.
8. Brokatzky D, Dorflinger B, Haimovici A, Weber A, Kirschnek S, Vier J, et al. A non-death function of the mitochondrial apoptosis apparatus in immunity. *EMBO J*. 2019;38(11).
9. Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, Bock F, Cloix C, Cao K, et al. Mitochondrial permeabilization engages NF-kappaB-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat Cell Biol*. 2017;19(9):1116-29.
10. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14376-81.
11. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*. 2005;1(2):66-74.
12. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncletic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*. 2000;182(1):41-9.
13. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1106-21.
14. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(5):330-49.
15. Neumann S, El Maadidi S, Faletti L, Haun F, Labib S, Schejtman A, et al. How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? *Virus Res*. 2015;209:45-55.

16. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med.* 1997;48:267-81.
17. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231-41.
18. Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.* 1995;14(24):6136-47.
19. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):935-8.
20. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
21. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991;66(2):233-43.
22. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992;267(15):10709-15.
23. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995;267(5203):1449-56.
24. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
25. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32401-10.
26. Smith RA, Baglioni C. Characterization of TNF receptors. *Immunol Ser.* 1992;56:131-47.
27. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989;245(4915):301-5.
28. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989;169(5):1747-56.
29. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* 1995;270(14):7795-8.
30. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995;81(4):505-12.
31. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):26-35.
32. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, et al. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor

- clustering. *Nature*. 2009;457(7232):1019-22.
33. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*. 2000;103(2):273-82.
 34. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:561-86.
 35. Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J*. 2004;382(Pt 2):651-7.
 36. Pop C, Fitzgerald P, Green DR, Salvesen GS. Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry*. 2007;46(14):4398-407.
 37. 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;94(4):491-501.
 38. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996;10(22):2859-69.
 39. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481-90.
 40. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7320-6.
 41. Green DR. A Matter of Life and Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(1).
 42. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12).
 43. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*. 2000;14(16):2060-71.
 44. Finucane DM, Bossy-Wetzell E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem*. 1999;274(4):2225-33.
 45. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275(5303):1129-32.
 46. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
 47. 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;102(1):43-53.
 48. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Núñez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo j*. 1999;18(13):3586-95.
 49. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c

and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17941-5.

50. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549-56.

51. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999;13(24):3179-84.

52. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998;1(7):949-57.

53. Saita S, Nolte H, Fiedler KU, Kashkar H, Venne AS, Zahedi RP, et al. PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2017;19(4):318-28.

54. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;406(6798):855-62.

55. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 2000;408(6815):1008-12.

56. Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis.* 2002;7(2):163-6.

57. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144(2):281-92.

58. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12815-9.

59. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50.

60. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):108-16.

61. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998;391(6662):96-9.

62. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

63. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):691-9.

64. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, et al. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell.* 2011;44(4):517-31.

65. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S2-19.

66. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer

membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 2008;18(4):157-64.

67. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.

68. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* 2007;315(5813):856-9.

69. Hacker G, Weber A. BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys.* 2007;462(2):150-5.

70. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2002;2(3):183-92.

71. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.

72. Deshmukh M, Johnson EM, Jr. Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron.* 1998;21(4):695-705.

73. Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S, et al. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol.* 1999;144(5):883-9.

74. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2005;435(7042):677-81.

75. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell.* 2006;9(5):351-65.

76. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005;17(3):393-403.

77. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2006;10(5):375-88.

78. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* 2006;10(5):389-99.

79. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1071-80.

80. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature.* 2016;538(7626):477-82.

81. Yasuda Y, Ozasa H, Kim YH, Yamazoe M, Ajimizu H, Yamamoto Funazo T, et al. MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-X(L) expression. *Cell Death Dis.* 2020;11(3):177.

82. Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ.* 2007;14(2):387-91.
83. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis.* 2003;8(4):345-52.
84. Van Noorden CJ. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem.* 2001;103(3):241-51.
85. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32608-13.
86. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* 1999;6(6):497-507.
87. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):313-21.
88. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1(6):489-95.
89. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009;137(6):1112-23.
90. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e437.
91. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988;35:95-125.
92. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179-204.
93. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(3):155-68.
94. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(8):616-27.
95. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001;15(17):2177-96.
96. Walworth N, Davey S, Beach D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature.* 1993;363(6427):368-71.
97. Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14795-800.
98. Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, et al. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet

correlates with tissue biology. *Cancer Res.* 2001;61(13):4990-3.

99. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461(7267):1071-8.

100. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9.

101. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462-7.

102. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-68.

103. Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL. H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9113-26.

104. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733.

105. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res.* 2011;21(2):223-44.

106. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986;47(6):921-8.

107. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2013;34(6):282-9.

108. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441(7092):431-6.

109. Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(13):4700-4.

110. Ghosh S, Gifford AM, Riviere LR, Tempst P, Nolan GP, Baltimore D. Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell.* 1990;62(5):1019-29.

111. Nolan GP, Ghosh S, Liou HC, Tempst P, Baltimore D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell.* 1991;64(5):961-9.

112. Ruben SM, Dillon PJ, Schreck R, Henkel T, Chen CH, Maher M, et al. Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science.* 1991;251(5000):1490-3.

113. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.

114. Tergaonkar V, Correa RG, Ikawa M, Verma IM. Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity. *Nat Cell Biol.*

2005;7(9):921-3.

115. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.

116. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 2006;25(51):6831-43.

117. Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol.* 2003;326(1):105-15.

118. Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K. Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo j.* 2003;22(23):6277-88.

119. Cheung PC, Nebreda AR, Cohen P. TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J.* 2004;378(Pt 1):27-34.

120. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.* 2006;22(2):245-57.

121. Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T. Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 1999;274(15):10641-8.

122. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science.* 1995;270(5244):2008-11.

123. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 1997;91(2):243-52.

124. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63.

125. Lang V, Janzen J, Fischer GZ, Soneji Y, Beinke S, Salmeron A, et al. betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol Cell Biol.* 2003;23(1):402-13.

126. Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* 2008;29(10):469-78.

127. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol.* 2002;3(10):958-65.

128. Berberich I, Shu GL, Clark EA. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol.* 1994;153(10):4357-66.

129. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002;17(4):525-35.

130. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res.* 2011;21(1):71-85.

131. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26243-50.
132. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell.* 2007;131(4):669-81.
133. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, et al. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1364-70.
134. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001;293(5534):1495-9.
135. Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3792-7.
136. Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V. RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23278-84.
137. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004;382(Pt 2):393-409.
138. Ray LB, Sturgill TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(11):3753-7.
139. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
140. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 1991;65(4):663-75.
141. Kholodenko BN, Birtwistle MR. Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1(1):28-44.
142. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000;103(2):239-52.
143. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002;298(5600):1911-2.
144. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40.
145. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006;24(1):21-44.
146. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1213-26.

147. Warne PH, Viciano PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 1993;364(6435):352-5.
148. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 1993;74(1):205-14.
149. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ. A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol*. 1995;15(10):5214-25.
150. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(2):180-6.
151. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994;78(6):1039-49.
152. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*. 1996;16(3):1247-55.
153. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265(5173):808-11.
154. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15(1):11-8.
155. Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, et al. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene*. 2004;336(1):1-13.
156. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76(6):1025-37.
157. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369(6476):156-60.
158. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. 1993;7(11):2135-48.
159. Adler V, Pincus MR, Minamoto T, Fuchs SY, Bluth MJ, Brandt-Rauf PW, et al. Conformation-dependent phosphorylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1686-91.
160. Gupta S, Campbell D, Dérijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1995;267(5196):389-93.
161. Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Dérijard B, Moore G, et al. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev*. 1994;8(24):2996-3007.
162. Yue J, López JM. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
163. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes

- and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10541-6.
164. Wolf ER, McAtarsney CP, Bredhold KE, Kline AM, Mayo LD. Mutant and wild-type p53 form complexes with p73 upon phosphorylation by the kinase JNK. *Sci Signal*. 2018;11(524).
165. Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40944-9.
166. Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25215-22.
167. Putcha GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, et al. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*. 2003;38(6):899-914.
168. Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*. 2009;16(3):368-77.
169. Retief FP, Cilliers L. The epidemic of Athens, 430-426 BC. *S Afr Med J*. 1998;88(1):50-3.
170. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
171. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2001;2(10):947-50.
172. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012;36(5):705-16.
173. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. 2004;25(2):75-84.
174. Nomiya H, Osada N, Yoshie O. The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(4):253-62.
175. Yoshie O, Imai T, Nomiya H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol*. 2001;78:57-110.
176. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006;7(12):243.
177. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
178. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4903-8.
179. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo j*. 1999;18(7):1723-9.
180. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28(4):477-87.
181. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines:

From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433.

182. Patel L, Charlton SJ, Chambers JK, Macphee CH. Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine*. 2001;14(1):27-36.

183. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253(5025):1278-80.

184. Schröder JM, Sticherling M, Henneicke HH, Preissner WC, Christophers E. IL-1 alpha or tumor necrosis factor-alpha stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dermal fibroblasts. *J Immunol*. 1990;144(6):2223-32.

185. Seaton A, Scullin P, Maxwell PJ, Wilson C, Pettigrew J, Gallagher R, et al. Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1148-56.

186. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res*. 2011;71(15):5296-306.

187. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258(5089):1798-801.

188. Singh S, Sadanandam A, Nannuru KC, Varney ML, Mayer-Ezell R, Bond R, et al. Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2380-6.

189. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S460-75.

190. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(6):539-52.

191. Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation*. 2017;40(1):340-9.

192. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med*. 1998;338(22):1592-600.

193. Gleich GJ, Loegering DA, Maldonado JE. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. *J Exp Med*. 1973;137(6):1459-71.

194. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2423-31.

195. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.

196. Collins PD, Jose PJ, Williams TJ. The sequential generation of neutrophil chemoattractant proteins in acute inflammation in the rabbit in vivo. Relationship between C5a and proteins with the characteristics of IL-8/neutrophil-activating

protein 1. *J Immunol.* 1991;146(2):677-84.

197. Jose PJ, Collins PD, Perkins JA, Beaubien BC, Totty NF, Waterfield MD, et al. Identification of a second neutrophil-chemoattractant cytokine generated during an inflammatory reaction in the rabbit peritoneal cavity in vivo. Purification, partial amino acid sequence and structural relationship to melanoma-growth-stimulatory activity. *Biochem J.* 1991;278 (Pt 2)(Pt 2):493-7.

198. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, et al. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell.* 1997;91(3):385-95.

199. Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M. Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol.* 1991;96(5):690-4.

200. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* 2009;30(11):531-7.

201. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28(8):340-5.

202. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014;15(7):602-11.

203. van Gisbergen KP, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* 2005;26(12):626-31.

204. Soehnlein O. An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. *Trends Immunol.* 2009;30(11):511-2.

205. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, et al. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity.* 2005;22(1):31-42.

206. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392-404.

207. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:439-56.

208. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2752-6.

209. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7(3):311-7.

210. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117(4):902-9.

211. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol.* 2009;10(11):1200-7.

212. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.

J Exp Med. 1968;128(3):415-35.

213. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 1999;11(6):753-61.

214. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.

215. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.

216. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-75.

217. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol*. 2011;12(8):778-85.

218. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145-9.

219. Cella M, Miller H, Song C. Beyond NK cells: the expanding universe of innate lymphoid cells. *Front Immunol*. 2014;5:282.

220. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-66.

221. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517(7534):293-301.

222. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):117-21.

223. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*. 2013;14(3):221-9.

224. Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*. 2014;157(2):340-56.

225. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity*. 2013;38(4):769-81.

226. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 2004;20(4):477-94.

227. Yagi R, Zhong C, Northrup DL, Yu F, Bouladoux N, Spencer S, et al. The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity*. 2014;40(3):378-88.

228. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et

- al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1055-62.
229. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010;463(7280):540-4.
230. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1045-54.
231. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 2010;464(7293):1367-70.
232. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* 2011;12(1):21-7.
233. Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, et al. Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. *Science.* 2010;330(6004):665-9.
234. Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol.* 2009;10(1):66-74.
235. Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature.* 1992;358(6381):66-70.
236. Parr EL, Young LH, Parr MB, Young JD. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J Immunol.* 1990;145(7):2365-72.
237. Seillet C, Belz GT, Huntington ND. Development, Homeostasis, and Heterogeneity of NK Cells and ILC1. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;395:37-61.
238. Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol.* 2016;17(7):758-64.
239. Sojka DK, Plougastel-Douglas B, Yang L, Pak-Wittel MA, Artyomov MN, Ivanova Y, et al. Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells. *Elife.* 2014;3:e01659.
240. Sojka DK, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. *Semin Immunol.* 2014;26(2):127-31.
241. Tessmer MS, Reilly EC, Brossay L. Salivary gland NK cells are phenotypically and functionally unique. *PLoS Pathog.* 2011;7(1):e1001254.
242. Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol.* 2002;3(6):523-8.
243. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* 2013;34(12):573-82.

244. Leclercq G, Debacker V, de Smedt M, Plum J. Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. *J Exp Med*. 1996;184(2):325-36.
245. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V. Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells. *J Immunol*. 1999;163(5):2648-56.
246. Koka R, Burkett PR, Chien M, Chai S, Chan F, Lodolce JP, et al. Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice. *J Exp Med*. 2003;197(8):977-84.
247. Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol*. 1991;3(1):49-55.
248. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol*. 2004;5(10):996-1002.
249. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:535-62.
250. Ho EL, Carayannopoulos LN, Poursine-Laurent J, Kinder J, Plougastel B, Smith HR, et al. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol*. 2002;169(7):3667-75.
251. Schwarz BA, Bhandoola A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol Rev*. 2006;209:47-57.
252. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*. 2001;194(2):127-34.
253. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):309-22.
254. Levelt CN, Carsetti R, Eichmann K. Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes. *J Exp Med*. 1993;178(6):1867-75.
255. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
256. Ziegler SF. Division of labour by CD4(+) T helper cells. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(7):403.
257. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today*. 1992;13(10):379-81.
258. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
259. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-67.
260. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011;35(2):161-8.
261. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell

recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402.

262. Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science*. 1999;283(5408):1745-8.

263. Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*. 2012;3(2):62-70.

264. Jones BD, Lee CA, Falkow S. Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun*. 1992;60(6):2475-80.

265. Besser JM. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiol*. 2018;71:55-9.

266. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect*. 2000;2(2):145-56.

267. Schlumberger MC, Hardt WD. *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(1):46-54.

268. Francis CL, Starnbach MN, Falkow S. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol Microbiol*. 1992;6(21):3077-87.

269. Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL. Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun*. 1995;63(1):356-9.

270. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(1):53-66.

271. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, et al. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 1999;401(6755):804-8.

272. Spees AM, Kingsbury DD, Wangdi T, Xavier MN, Tsolis RM, Bäumlér AJ. Neutrophils are a source of gamma interferon during acute *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun*. 2014;82(4):1692-7.

273. Scanu T, Spaapen RM, Bakker JM, Prata CB, Wu LE, Hofland I, et al. *Salmonella* Manipulation of Host Signaling Pathways Provokes Cellular Transformation Associated with Gallbladder Carcinoma. *Cell Host Microbe*. 2015;17(6):763-74.

274. Bébéar C, de Barbeyrac B. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(1):4-10.

275. Stephens RS. The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis. *Trends Microbiol*. 2003;11(1):44-51.

276. De Clercq E, Kalmar I, Vanrompay D. Animal models for studying female genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 2013;81(9):3060-7.

277. Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(5):949-59.

278. Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular

- survival strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(5):a010256.
279. Raulston JE. Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. *Mol Microbiol.* 1995;15(4):607-16.
280. Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T. Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry. *Cell Microbiol.* 2005;7(12):1714-22.
281. Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Locht C. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1379-86.
282. Zhang JP, Stephens RS. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell.* 1992;69(5):861-9.
283. Fadel S, Eley A. Chlamydia *trachomatis* OmcB protein is a surface-exposed glycosaminoglycan-dependent adhesin. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 1):15-22.
284. Mölleken K, Schmidt E, Hegemann JH. Members of the Pmp protein family of *Chlamydia pneumoniae* mediate adhesion to human cells via short repetitive peptide motifs. *Mol Microbiol.* 2010;78(4):1004-17.
285. Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):11143-8.
286. Mehlitz A, Rudel T. Modulation of host signaling and cellular responses by Chlamydia. *Cell Commun Signal.* 2013;11:90.
287. Shimazaki K, Wadehra M, Forbes A, Chan AM, Goodglick L, Kelly KA, et al. Epithelial membrane protein 2 modulates infectivity of *Chlamydia muridarum* (MoPn). *Microbes Infect.* 2007;9(8):1003-10.
288. Puolakkainen M, Kuo CC, Campbell LA. *Chlamydia pneumoniae* uses the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor for infection of endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(8):4620-5.
289. Davis CH, Raulston JE, Wyrick PB. Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun.* 2002;70(7):3413-8.
290. Conant CG, Stephens RS. Chlamydia attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cell Microbiol.* 2007;9(1):222-32.
291. Abromaitis S, Stephens RS. Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000357.
292. Mueller KE, Plano GV, Fields KA. New frontiers in type III secretion biology: the Chlamydia perspective. *Infect Immun.* 2014;82(1):2-9.
293. Saka HA, Thompson JW, Chen YS, Kumar Y, Dubois LG, Moseley MA, et al. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol Microbiol.* 2011;82(5):1185-203.
294. Damiani MT, Gambarte Tudela J, Capmany A. Targeting eukaryotic Rab

proteins: a smart strategy for chlamydial survival and replication. *Cell Microbiol.* 2014;16(9):1329-38.

295. Cocchiaro JL, Valdivia RH. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol.* 2009;11(11):1571-8.

296. Grieshaber SS, Grieshaber NA, Hackstadt T. Chlamydia trachomatis uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 18):3793-802.

297. Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4877-81.

298. Carabeo RA, Mead DJ, Hackstadt T. Golgi-dependent transport of cholesterol to the Chlamydia trachomatis inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):6771-6.

299. Todd WJ, Caldwell HD. The interaction of Chlamydia trachomatis with host cells: ultrastructural studies of the mechanism of release of a biovar II strain from HeLa 229 cells. *J Infect Dis.* 1985;151(6):1037-44.

300. Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11430-5.

301. Deka S, Vanover J, Dessus-Babus S, Whittimore J, Howett MK, Wyrick PB, et al. Chlamydia trachomatis enters a viable but non-cultivable (persistent) state within herpes simplex virus type 2 (HSV-2) co-infected host cells. *Cell Microbiol.* 2006;8(1):149-62.

302. Kiviat NB, Paavonen JA, Wølner-Hanssen P, Critchlow CW, Stamm WE, Douglas J, et al. Histopathology of endocervical infection caused by Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus, Trichomonas vaginalis, and Neisseria gonorrhoeae. *Hum Pathol.* 1990;21(8):831-7.

303. Lijek RS, Helble JD, Olive AJ, Seiger KW, Starnbach MN. Pathology after Chlamydia trachomatis infection is driven by nonprotective immune cells that are distinct from protective populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(9):2216-21.

304. Zortel T, Schmitt-Graeff A, Kirschnek S, Hacker G. Apoptosis Modulation in the Immune System Reveals a Role of Neutrophils in Tissue Damage in a Murine Model of Chlamydial Genital Infection. *J Infect Dis.* 2018;217(11):1832-43.

305. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164(10):4991-5.

306. Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, Kullberg BJ, van der Meer JW, Netea MG. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22(1):11-4.

307. Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity.* 2003;18(3):355-65.

308. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to

Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99(1):77-87.

309. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 2009;461(7265):788-92.

310. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol.* 1999;19(12):8469-78.

311. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo j.* 2004;23(8):1889-99.

312. Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine.* 2018;101:26-32.

313. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell.* 2007;131(4):682-93.

314. Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods Enzymol.* 2014;545:35-65.

315. Rehm M, Dussmann H, Prehn JH. Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis. *J Cell Biol.* 2003;162(6):1031-43.

316. Häcker G. Apoptosis in infection. *Microbes Infect.* 2018;20(9-10):552-9.

317. Dörflinger B, Badr MT, Haimovici A, Fischer L, Vier J, Metz A, et al. Mitochondria supply sub-lethal signals for cytokine secretion and DNA-damage in *H. pylori* infection. *Cell Death Differ.* 2022;29(11):2218-32.

318. Andree M, Seeger JM, Schüll S, Coutelle O, Wagner-Stippich D, Wiegmann K, et al. BID-dependent release of mitochondrial SMAC dampens XIAP-mediated immunity against *Shigella*. *Embo j.* 2014;33(19):2171-87.

319. Rank RG, Lacy HM, Goodwin A, Sikes J, Whittimore J, Wyrick PB, et al. Host chemokine and cytokine response in the endocervix within the first developmental cycle of *Chlamydia muridarum*. *Infect Immun.* 2010;78(1):536-44.

320. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature.* 2017;548(7668):466-70.

321. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature.* 2017;548(7668):461-5.

322. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ.* 2006;13(5):773-84.

323. Hinz M, Stilmann M, Arslan SC, Khanna KK, Dittmar G, Scheiderei C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell.* 2010;40(1):63-74.

324. Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. DNA Damage Response and Immune Defense. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20).

325. Biton S, Ashkenazi A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling. *Cell*. 2011;145(1):92-103.
326. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(9):501-21.
327. McArthur K, Whitehead LW, Heddleston JM, Li L, Padman BS, Oorschot V, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science*. 2018;359(6378).
328. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*. 2013;339(6121):826-30.
329. Zhang X, Wu J, Du F, Xu H, Sun L, Chen Z, et al. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep*. 2014;6(3):421-30.
330. Zhang C, Shang G, Gui X, Zhang X, Bai XC, Chen ZJ. Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature*. 2019;567(7748):394-8.
331. Yum S, Li M, Fang Y, Chen ZJ. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- κ B that mediate immune defense against tumors and viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(14).
332. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*. 2016;17(10):1142-9.
333. Haimovici A, Hofer C, Badr MT, Bavafaye Haghghi E, Amer T, Boerries M, et al. Spontaneous activity of the mitochondrial apoptosis pathway drives chromosomal defects, the appearance of micronuclei and cancer metastasis through the Caspase-Activated DNase. *Cell Death Dis*. 2022;13(4):315.
334. Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, et al. Requirement for caspase-8 in NF- κ B activation by antigen receptor. *Science*. 2005;307(5714):1465-8.
335. Ning X, Wang Y, Jing M, Sha M, Lv M, Gao P, et al. Apoptotic Caspases Suppress Type I Interferon Production via the Cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol Cell*. 2019;74(1):19-31 e7.
336. Rebsamen M, Meylan E, Curran J, Tschopp J. The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases. *Cell Death Differ*. 2008;15(11):1804-11.
337. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(19):2514-26.
338. Rajput A, Kovalenko A, Bogdanov K, Yang SH, Kang TB, Kim JC, et al. RIG-I RNA helicase activation of IRF3 transcription factor is negatively regulated by caspase-8-mediated cleavage of the RIP1 protein. *Immunity*. 2011;34(3):340-51.
339. El Maadidi S, Faletti L, Berg B, Wenzl C, Wieland K, Chen ZJ, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate

antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis. *J Immunol.* 2014;192(3):1171-83.

340. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004;5(7):730-7.

341. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-5.

342. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol.* 2005;6(10):981-8.

343. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.

344. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68(9):3421-8.

345. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005;19(11):1294-305.

346. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):1-6.

347. Morales AA, Gutman D, Lee KP, Boise LH. BH3-only proteins Noxa, Bmf, and Bim are necessary for arsenic trioxide-induced cell death in myeloma. *Blood.* 2008;111(10):5152-62.

348. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J.* 1997;16(7):1686-94.

349. Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Muer A, Overkamp T, et al. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J Cell Biol.* 2010;188(6):851-62.

350. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(19):10057-62.

351. Favaro F, Luciano-Mateo F, Moreno-Caceres J, Hernandez-Madrigal M, Both D, Montironi C, et al. TRAIL receptors promote constitutive and inducible IL-8 secretion in non-small cell lung carcinoma. *Cell Death Dis.* 2022;13(12):1046.

352. Matsushima K, Yang D, Oppenheim JJ. Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine.* 2022;153:155828.

353. Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(8):1326-36.

354. Naseer N, Zhang J, Bauer R, Constant DA, Nice TJ, Brodsky IE, et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Induces NAIP/NLRC4- and

NLRP3/ASC-Independent, Caspase-4-Dependent Inflammasome Activation in Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2022;90(7):e0066321.

355. Barth S, Kirschnek S, Ortmann N, Tanriver Y, Hacker G. The Reaction of Innate Lymphoid Cells in the Mouse Female Genital Tract to Chlamydial Infection. *Infect Immun.* 2021;89(11):e0080020.

356. Morrison RP, Feilzer K, Tumas DB. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect Immun.* 1995;63(12):4661-8.

357. Sun X, Tian Q, Wang L, Xue M, Zhong G. IL-6-mediated signaling pathways limit *Chlamydia muridarum* infection and exacerbate its pathogenicity in the mouse genital tract. *Microbes Infect.* 2017;19(11):536-45.

IX. ANHANG

1.1. Ergebnistabelle der Apoptose-assoziierten Zelllinien bzgl. der Zytokinsekretion/Caspase-3-Aktivierung nach Inhibitorbehandlung

Legende:

Behandlungen:

1) S63845 2) S63845 + pan-Caspasen Inhibitor

3) ABT-737 4) ABT-737 + pan-Caspasen Inhibitor

Beobachtungen:

↑ = erhöht; ↓ = reduziert; ± = vergleichbar: jeweils gegenüber CTRL

Tabelle 22 Ergebnistabelle der Inhibitorbehandlungen Apoptose-assoziiierter Zelllinien

Zelllinien	Behandlung	Caspase-3-Aktivierung	IL-6	IL-8	CXCL-1
Bcl-X _L -defizient	1)	±	↓	↓	↓
	2)	±	±	±	±
	3)	↑	↓	±	±
	4)	±	±	±	±
Mcl-1-defizient	1)	↓	↑	↓	↓
	2)	±	↑	±	±
	3)	±	↑	±	±
	4)	↑	↑	±	±
Bcl-X _L -überexpr.	1)	↓	↓	↓	↓
	2)	↓	↓	↓	↓
	3)	↓	↓	↓	↓
	4)	↓	↓	↓	↓
Bax-defizient	1)	↓	↓	↓	↓
	2)	↓	↓	±	±
	3)	↓	↑	↑	↑
	4)	±	↑	±	±

Bak-defizient	1)	↓	↓	↓	↓
	2)	↓	↓	±	±
	3)	↓	↓	±	±
	4)	±	±	±	±
Bax/Bak-doppelt-defizient	1)	↓	↓	↓	↓
	2)	↓	↓	↓	↓
	3)	↓	↓	↓	↓
	4)	↓	↓	↓	↓
Smac-defizient	1)	↓	↑	↓	↓
	2)	-	±	↓	±
	3)	↓	±	±	↓
	4)	-	-	-	-
PARL-defizient	1)	↓	↑	↓	↓
	2)	-	-	-	-
	3)	↓	↑	±	±
	4)	-	-	-	-
XIAP-defizient	1)	±	↓	↑	↓
	2)	-	↓	↑	±
	3)	±	↑	±	±
	4)	-	-	-	-
Caspase-8-defizient	1)	±	↓	↑	↓
	2)	-	↑	↑	v
	3)	±	↓	↑	↓
	4)	-	-	-	-
Apaf-1-defizient	1)	↓	↑	↓	↓
	2)	-	-	-	-
	3)	↓	↑	↓	±
	4)	-	-	-	-
Caspase-9-defizient	1)	-	↑	↓	↓
	2)	-	-	-	-

	3)	-	↑	±	±
	4)	-	-	-	-
CAD-defizient	1)	±	↓	↓	↓
	2)	-	↓	↓	↓
	3)	↓	↓	↓	↓
	4)	-	-	-	-

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose.....	6
Abbildung 2: Angriffspunkte der Inhibitoren	10
Abbildung 3: Klassischer und alternativer NF- κ B-Signalweg.....	14
Abbildung 4: Signalwege der MAP-Kinasen.....	17
Abbildung 5: Entwicklungszyklus von <i>Chlamydia trachomatis/muridarum</i>	27
Abbildung 6: Identifizierung der myeloiden Zellen aus dem murinen Genitaltrakt	56
Abbildung 7: Identifizierung der NK-, ILC1- und T-Zellen aus dem murinen Genitaltrakt.....	57
Abbildung 8: Definierung der aktiven Caspase-3-positiven Zellen.....	59
Abbildung 9: Auswirkung des Apoptosesignalwegs auf die Zytokinsekretion ...	64
Abbildung 10: Bax/Bak-abhängige Caspasenaktivierung und Zytokinsekretion ..	69
Abbildung 11: Kinetik der Zytokinsekretion	72
Abbildung 12: Beteiligung der MAP-Kinasen am subletalen Apoptosesignalweg	76
Abbildung 13: Nach subletalen Apoptosestimuli spielt der NF- κ B-Signalweg keine erkennbare Rolle in der Zytokinsekretion	78
Abbildung 14: Apoptose und Zytokinsekretion in Abwesenheit anti-apoptotischer Proteine	82
Abbildung 15: CAD-abhängige Zytokinsekretion	85
Abbildung 16: Zytokinsekretion infolge der Salmonellen-Infektion erfolgt mit geringem Einfluss von Proteinen der Apoptosesignaltransduktion	89
Abbildung 17: Muriner weiblicher Genitaltrakt.....	90
Abbildung 18: Reduzierte Infiltration von Immunzellen im unteren Genitaltrakt der Smac-defizienten Mäuse	93
Abbildung 19: Abschnitte des murinen FGT für RNA-Isolation.....	94
Abbildung 20: Geringe Chemokinexpression bei Smac-defizienten Mäusen.....	96
Abbildung 21: Erhöhte messbare Chlamydienlast in den Smac-defizienten Mäusen	98

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	29
Tabelle 2: Zelllinien.....	30
Tabelle 3: Bakterien.....	32
Tabelle 4: Antibiotika	32
Tabelle 5: Primäre Antikörper	33
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.....	34
Tabelle 7: Antikörper für Immunzellfärbung (FACS Fortessa™)	34
Tabelle 8: Kommerzielle KITs	36
Tabelle 9: Mausstämme	36
Tabelle 10: Primer für Genotypisierung der Mäuse	37
Tabelle 11: Primer für RT-qPCR.....	37
Tabelle 12: Puffer und Lösungen.....	37
Tabelle 13: Medien und Zusatzstoffe für Zellkultur.....	40
Tabelle 14: Chemikalien und Reagenzien	40
Tabelle 15: Computerprogramme	43
Tabelle 16: PCR-Konditionen für Maus-Genotypisierung (<i>DIABLO</i> ^{-/-})	49
Tabelle 17: Komponente für Herstellung von cDNA aus FGT der Maus für den Nachweis der Chemokinexpression mittels RT-qPCR	50
Tabelle 18: PCR-Konditionen zum Nachweis der Chemokinexpression.....	50
Tabelle 19: Komponente für RT-qPCR für <i>C. muridarum</i> Standard	51
Tabelle 20: RT-qPCR-Konditionen für die Detektion von <i>C. muridarum</i> Genomkopien	51
Tabelle 21: Komponente für DNA für RT-qPCR zum Chlamydien Nachweis	52
Tabelle 22 Ergebnistabelle der Inhibitorbehandlungen Apoptose-assoziiierter Zelllinien	145

XII. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Gerd Sutter dafür danken diese Doktorarbeit überhaupt durchführen zu können, indem er sich damals bereit erklärt hat die Doktorvaterschaft zu übernehmen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Markus Meißner für die spontane Übernahme der Doktorvaterschaft danken. Herzlichen Dank für Ihre Unterstützung und Zeit.

Mein größter Dank geht an Prof. Dr. Georg Häcker, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit in seinem Labor durchzuführen. Mit deiner unendlichen Expertise hast du mich stets unterstützt und bei Problemen oder Anliegen hattest du immer ein offenes Ohr. Vielen Dank auch für die hilfreichen Korrekturen der vorliegenden Arbeit. Deine Begeisterungsfähigkeit für Forschung und das stetige Hinterfragen von Beobachtungen haben mich sehr geprägt und inspiriert. Vielen Dank für Alles.

Weiter möchte ich meiner Betreuerin Dr. Susanne Kirschnek für die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung danken. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Juliane Vier und Arlena Metz für die Hilfsbereitschaft und vielen schönen Gespräche bedanken. Ihr seid das Herzstück des Labors.

Dr. Dominik Brokatzky möchte ich für die Einarbeitung in die *in vitro* Zellkulturtechniken danken. Ebenso möchte ich Dr. Colins Waguia Kontchou, Dr. Ian Gentle, Dr. Aladin Haimovici, Juliane Vier und Dr. Sylwia Gradzka-Boberda für die Bereitstellung diverser Zelllinien danken.

Dr. Svenja Ramsperger (geb. Barth) möchte ich für die Einarbeitung in die *in vivo* Infektionsmodelle danken und dass ich eine so enge Freundin wie dich in meiner Doktorarbeitszeit gewinnen durfte; auf viele weitere gemeinsame Jahre.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Benedikt Dörflinger, deine Begeisterungsfähigkeit ist einfach ansteckend und selbst nachts (nach 14-stündiger Analyse) herrscht mit dir noch gute Laune im FACS-Raum. Danke für deine Freundschaft und die vielen Unternehmungen.

Weiter möchte ich mich bei allen „AG Häcker *lab members*“ bedanken. Ich werde immer sehr gerne an die gemeinsame Zeit mit euch zurückdenken. Ganz besonders an alle im „3rd *floor office*“ für eine so wundervolle Atmosphäre.

Allen voran Dr. Sylwia Gradzka-Boberda, du bist eine wundervolle, herzliche Person und die vielen Gespräche und gemeinsamen Abendessen waren immer wunderschön.

Ebenso bei Lang Peng, schade, dass du erst in meinem „letzten Jahr“ zu uns gekommen bist. Die Arbeit mit dir hat einfach super viel Spaß gemacht.

Des Weiteren möchte ich Henry Oehler für die vielen gemeinsamen Stunden bei der konfokalen Mikroskopie, die hilfreichen Tipps für meine Präsentationen und die schönen Koch- und Konzertabende danken.

Zum Schluss möchte ich mich herzlich bei meiner Familie (allen voran meiner Mama) und meinen Freund*innen für die liebevolle Unterstützung bedanken – ihr seid großartig. Ben, vielen Dank für deine Hilfe bei der Formatierung des *word*-Dokuments - du hast mich vor der Verzweiflung bewahrt.

Last but not least Tom, vielen Dank für deine immerwährende Unterstützung, dein mathematisches *know-how*, deine Motivation und dass du immer für gut gefüllte Eisvorräte und Nutella gesorgt hast.