

Identifikation des
Low density lipoprotein receptor related
***protein 1* als neuer Annexin A1 Rezeptor**

Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprechts-Karl-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom Biochemikerin Alexandra Kurz

aus Salzgitter

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2014

Gutachter: Prof. Dr. Martin Müller
DKFZ Heidelberg

Prof. Dr. Peter H. Krammer
DKFZ Heidelberg

Das Leben ist wie Feuer, es brennt und es wärmt.

- Thees Uhlmann

Danksagung

Moin, moin Heidelberg! So hieß es vor nun fast 4 Jahren als sich ein Nordlicht in den Süden Deutschlands begab, um dort einen in vielerlei Hinsicht lehrreichen Lebensabschnitt zu durchlaufen. Den Personen, die diese Zeit geprägt haben, möchte ich nun meinen Dank aussprechen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Peter H. Krammer dafür bedanken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, meine Promotionsarbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen. „Rezeptor, Rezeptor, Rezeptor!“ war das Motto der letzten Jahre und hat mich immer wieder gefordert, einen Schritt weiterzugehen, Zusammenhänge zu ergründen und mich kritisch damit auseinander zu setzen. Darüber hinaus hatte ich die einmalige Gelegenheit durch seine Erzählungen hinter die Kulissen mehrerer Jahrzehnte immunologischer Forschung blicken zu können. Die ausgeprägte Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit in der gesamten Abteilung hat sehr konstruktiv zu dieser Arbeit beigetragen und mich gelehrt, sowohl die eigenen Daten als auch die anderer zu hinterfragen; eine Eigenschaft, die mich auch im weiteren Leben stets begleiten wird.

Bei Prof. Martin Müller und Prof. Felix Wieland bedanke ich mich für die Betreuung dieser Arbeit im Rahmen meines *Thesis Advisory Committee*. Insbesondere die sehr konstruktiven Kommentare und motivierenden Gespräche haben mir immer wieder neuen Antrieb verliehen. Herrn Prof. Martin Müller danke ich außerdem für die Erstellung meines Erstgutachtens.

Dem direkten Betreuer meiner Arbeit, Dr. Heiko Weyd, danke ich für seine vielen Anregungen, Ideen und stetiges Hinterfragen von Ergebnissen und Kontrollen, was die Erstellung dieser Arbeit maßgeblich vorangetrieben hat. Darüber hinaus ist seine unermüdliche Geduld zu würdigen, mir stets am FACS, alias der Höllenmaschine, mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beizutragen. Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Björn Linke, der nicht nur mein wandelndes Literaturverzeichnis war, sondern der auch einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Seine „*golden cloning hands*“ haben den Grundstein dieses Projektes gelegt, und das Labor wäre ohne sein Lachen deutlich langweiliger gewesen. Sandra Pfrang, sowie allen Auszubildenden möchte ich für all die helfenden Hände danken, auf die immer Verlass war und die mir die Arbeit oft erleichtert haben.

Ein großes Lob gilt Heiko, Björn, Jörg und Michael für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die vielen konstruktiven Anmerkungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Kooperationspartnern, die mittels Ihres Fachwissens bzw. der Bereitstellung von Materialien zu dieser Arbeit beigetragen haben. Dr. Klemens Wild und Simone Röhling vom BZH danke ich für die Hilfestellung bei der Generierung der AnxA1-Mutanten. Herrn Dr. Thomas Ruppert vom ZMBH möchte ich sowohl für das Durchführen der

MS-Analysen, als auch für die damit verbundenen Diskussionen der Daten danken. Frau Prof. Petra May von der Universität Düsseldorf danke ich für die Bereitstellung der MEF-Zelllinien, sowie den LRP1 KO-Mäusen. Insbesondere Dr. Katharina Billian-Frey, HI-STEM Heidelberg, gebührt großer Dank für die äußerst effiziente Durchführung und Unterstützung im Rahmen der ATTANA-Messungen.

Ein besonderer Dank geht an meine Mädels innerhalb und außerhalb des Labors, ohne die diese Wahnsinnszeit nicht ansatzweise so schön gewesen wäre. Lena, Kristina, Alex, Karen und Bianca: Ihr seid einfach großartig! Die vielen lustigen Abende, die aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so gut lief und das Gefühl, sich jederzeit auf Euch verlassen zu können sind unbezahlbar. Ihr habt es mir ermöglicht, mich in Heidelberg wohlfühlen und mich gelehrt, dass es manchmal die umgebenden Personen sind, die den Begriff „zu hause“ prägen. In Zukunft werde ich jedenfalls immer einen guten Grund haben, nach Heidelberg zurückzukehren.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern. Bedingungslos unterstützt Ihr mich mein Leben lang und haltet mir den Rücken frei, damit ich meine Träume und Ziele verwirklichen kann. Ohne Euch stünde ich in jeder Hinsicht nicht dort, wo ich jetzt bin und hätte nicht die Gelegenheit gehabt, zwischendurch auch noch die Welt zu sehen. Ihr habt mich zu einem Menschen mit Moral und Anstand erzogen, was heutzutage nicht mehr selbstverständlich ist und ich deswegen umso mehr zu schätzen weiß. Eure grenzenlose Liebe und Euer Vertrauen begleiten mich auf all meinen Wegen und lassen mir alle Türen der Welt offen stehen.

Die letzten Worte möchte ich dem wichtigsten Menschen in meinem Leben widmen, Dir, Stephan. Vermutlich kannst Du mittlerweile auch als BWLER einen Western Blot durchführen oder „DCs preppen“. Fast ein ganzes Jahrzehnt stehst Du nun an meiner Seite und hast mich bei allen Höhen und Tiefen begleitet. Lange Zeit war dies leider nur aus der Ferne möglich, aber auch dann warst Du mir immer ganz nah. Geduldig hast Du Dir all meine Geschichten aus dem täglichen Laborwahnsinn angehört und mir die Kraft gegeben, diese teils schwierige Zeit zu überstehen. Selbst ohne viele Worte hast dabei Du all meine Selbstzweifel ausgeräumt. Ohne Dich wäre ich kein Ganzes. DANKE.

“Stay hungry, stay young, stay foolish, stay curious, and above all, stay humble because just when you think you got all the answers, is the moment when some bitter twist of fate in the universe will remind you that you very much don’t.”

- Thomas Hiddleston

Zusammenfassung

Im Rahmen der Embryonalentwicklung oder der Gewebshomöostase entstehen kontinuierlich apoptotische Zellen, die effizient von professionellen Phagozyten, aber auch von nicht-professionellen Phagozyten aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Aufnahme von Pathogenen ist die Phagozytose apoptotischer Zellen (Efferozytose) ein anti-inflammatorischer Prozess. Somit trägt die Efferozytose essentiell zur Erhaltung der peripheren Toleranz bei, indem sie Immunreaktionen gegen Autoantigene verhindert. Die molekularen Mechanismen des immunsuppressiven Effekts der Efferozytose sind bis heute nur unzureichend aufgeklärt. Annexin A1 (AnxA1), ein intrazelluläres, Phospholipid-bindendes Protein, gehört zu den beschriebenen *eat me*-Signalen und transloziert an die Membran früh-apoptotischer Zellen. Darüber hinaus ist AnxA1 in der Lage, die Toll like Rezeptor (TLR)-vermittelte, pro-inflammatorische Antwort in dendritischen Zellen (DC) zu supprimieren.

Die Schlüsselfrage nach dem AnxA1-Rezeptor, der diese Immunsuppression auf DC vermittelt, blieb bislang jedoch unbeantwortet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deswegen eine neue UV-Kreuzvernetzungsmethode etabliert, um die Bindung von AnxA1 an seinen putativen Rezeptor mittels einer kovalenten Bindung zu stabilisieren. Dadurch konnte das *Low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) als potentieller AnxA1-Rezeptor identifiziert werden. Die Interaktion von LRP1 mit AnxA1, sowie mit weiteren Annexinen, wurde anhand verschiedenster Bindungsstudien *in vitro* validiert. Des Weiteren ermittelten *quartz crystal microbalance*-Studien eine hohe, Calcium-abhängige Bindungsaffinität von LRP1 an verschiedene Annexine. Anhand DC- und Makrophagen-spezifischer LRP1 *knock out*-Mäuse wurde die Rolle von LRP1 auf die AnxA1-vermittelte Immunsuppression untersucht. In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass AnxA1, neben der Suppression in DC, auch die TLR-induzierte Antwort in Makrophagen supprimiert. Diese Immunsuppression erfolgte sowohl in Makrophagen als auch in DC unabhängig von LRP1. Da LRP1 und AnxA1 im Kontext der Efferozytose beschrieben sind, wurde anschließend die Relevanz der Interaktion für die Phagozytose apoptotischer Zellen untersucht. Durch die putative Redundanz von *eat me*-Signalen und deren Rezeptoren konnte kein Einfluss des AnxA1-LRP1-Komplexes auf die Efferozytose nachgewiesen werden. Jedoch konnte in einem System, in dem einzelne *eat me*-Signale isoliert betrachtet wurden, gezeigt werden, dass LRP1 die Phagozytose von AnxA1-gekoppelten Beads in DC und nicht-professionellen Phagozyten beeinflusst.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig LRP1 als neuer Rezeptor für Annexine identifiziert und charakterisiert werden. Die AnxA1-LRP1-Interaktion vermittelt dabei nicht die Toleranzinduktion apoptotischer Zellen, sondern spielt eine wichtige Rolle bei Phagozytose-Prozessen. Durch die gezielte Manipulation der Interaktion von LRP1 mit verschiedenen Annexinen in Patienten mit Autoimmunerkrankungen, die auf einer defekten Efferozytose beruhen, könnte der AnxA1-LRP1-Komplex im therapeutischen Kontext von großem Interesse sein.

Abstract

Apoptotic cells continuously arise during embryogenesis or tissue-homoeostasis and are taken up by professional as well as non-professional phagocytes. In contrast to the uptake of pathogens, phagocytosis of apoptotic cells (efferocytosis) is an anti-inflammatory process. Therefore, efferocytosis contributes to the maintenance of peripheral tolerance preventing an immune response against self-antigens. The molecular mechanisms causing the immunosuppressive effect during efferocytosis are still not fully resolved. Annexin A1 (AnxA1) is amongst the already known proteins presenting eat me-signals and translocates to the surface of early-apoptotic cells. Furthermore, AnxA1 is able to suppress the toll-like receptor (TLR)-induced pro-inflammatory response in dendritic cells (DC).

The key question concerning the AnxA1-receptor that is mediating the immunosuppression in DC is still not clarified. The present study therefore established a UV-crosslinking method, to stabilize the binding between AnxA1 and its putative receptor. Thereby the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) was identified as a potential receptor for AnxA1. The interaction of LRP1 with AnxA1 and other annexins was validated by different *in vitro* binding studies. In addition, quartz crystal microbalance studies showed a calcium-dependent, high binding affinity of LRP1 to all the annexins tested. Using LRP1-specific macrophage and DC knock-out mice, the role of LRP1 in the context of the AnxA1-mediated immunosuppressive effect was investigated. For the first time, it was shown, that AnxA1, apart from DC, also suppresses the TLR-induced response in macrophages. This immunosuppression was independent of LRP1 in macrophages as well as in DC. Since LRP1 and AnxA1 are described to play a role in efferocytosis, the relevance of the AnxA1-LRP1 interaction for the uptake of apoptotic cells was investigated. Due to the putative redundancy of eat me-signals und efferocytosis-receptors, no prominent effect of the AnxA1-LRP1-Komplex for efferocytosis was detected. However, analyzing isolated eat me-signals, it was shown, that LRP1 is important for the phagocytosis of AnxA1-coated beads in DC as well as in non-professional phagocytes.

In summary, for the first time, the present study describes and characterizes LRP1 as an Annexin-receptor. The AnxA1-LRP1-interaction is not mediating tolerance induced by apoptotic cells but plays an important role for phagocytic processes. The well-directed manipulation of the AnxA1-LRP1-interaction could be of great interest in patients with autoimmune diseases, based on defective efferocytosis, hence revealing its therapeutic potential.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Zusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
Inhaltsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	2
1.1.3 Makrophagen & dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität.....	3
1.2 Endozytose, Phagozytose & Efferozytose	3
1.2.1 Signaltransduktion der Phagozytose	5
1.2.2 Immunologische Konsequenzen der defekten Efferozytose	7
1.3 Antigenpräsentation	8
1.4 T-Zell-Aktivierung	9
1.5 Immunologische Toleranz	10
1.5.1 Periphere Toleranz	10
1.5.2 Pro- und anti-inflammatorische APCs	12
1.6 Annexin A1.....	17
1.6.1 AnxA1-Struktur	17
1.6.2 Externalisierung und proteolytische Spaltung von AnxA1.....	19
1.6.3 Immunologische Funktionen von AnxA1	19
1.6.4 AnxA1-Rezeptoren.....	21
1.6.5 AnxA1 und Krankheiten	23
1.7 Low density lipoprotein receptor-related protein 1	24
1.7.1 LRP1-Struktur und -Liganden	24
1.7.2 LRP1 Funktion	26
1.8 Zielsetzung.....	31
2 Materialien.....	33
2.1 Reagenzien & Chemikalien	33
2.2 Kits & Zubehör	34
2.3 Geräte & Materialien	34

2.4	Puffer & Lösungen	35
2.5	Medien	37
2.5.1	Medium für Bakterien	37
2.5.2	Medien für eukaryotische Zellen	37
2.6	Biologisches Material	37
2.6.1	Bakterienstämme	37
2.6.2	Eukaryotische Zelllinien	38
2.6.3	Mausstämme	38
2.7	Materialien für die Molekularbiologie	38
2.7.1	PCR-Reagenzien	38
2.7.2	PCR-Primer	39
2.8	Antikörper.....	41
2.9	Software.....	41
3	Methoden	42
3.1	Molekularbiologische und immunologische Methoden.....	42
3.1.1	Aufreinigung von rekombinanten murinen AnxA1	42
3.1.2	Herstellung pBpa-modifizierter AnxA1-Varianten	42
3.1.3	Zelllyse und Proteinbestimmung	43
3.1.4	Immunpräzipitation.....	44
3.1.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.1.6	Western Blot & Immundetektion.....	44
3.1.7	Zytokin-ELISA.....	45
3.1.8	LRP1-Bindungsstudien	45
3.1.9	Liganden / Rezeptor Blot.....	46
3.1.10	RNA-Isolation.....	46
3.1.11	Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	47
3.1.12	Quantitative Real-Time PCR	47
3.1.13	Herstellung von AnxA1- oder PRMT6-gekoppelten fluoreszierenden Beads	47
3.2	Zellbiologische Experimente.....	48
3.2.1	Isolation muriner Knochenmarkszellen.....	48
3.2.2	Differenzierung muriner dendritischer Zellen (BMDC)	48
3.2.3	Differenzierung muriner Makrophagen	48
3.2.4	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	49
3.2.5	Apoptose-Induktion.....	49

3.2.6	Phagozytose-Experimente	50
3.2.7	Suppressions-Experimente	50
3.2.8	Färbung von T-Zellen mit Vybrant DiD	51
3.2.9	UV-Kreuzvernetzung von pBpa-modifiziertem AnxA1	51
3.2.10	Bestimmung von Bindungsaffinitäten	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Strategien zur Identifikation des AnxA1-Rezeptors.....	53
4.1.1	Immunpräzipitationen (IP) mit WT AnxA1	53
4.2	Inkorporation von p-Benzoyl-Phenylalanin in murines AnxA1	56
4.2.1	Auswahl der Aminosäuren für die pBpa-Inkorporation	56
4.2.2	Expression der pBpa-modifizierten AnxA1-Varianten	57
4.2.3	pBpa-AnxA1 Mutanten supprimieren die TLR-induzierte TNF- α -Expression unverändert zum WT AnxA1	63
4.3	Identifikation eines potentiellen AnxA1-Rezeptors mittels UV-Kreuzvernetzung	64
4.3.1	Etablierung der UV-Kreuzvernetzungs-IP mit pBpa-AnxA1 in Raw264.7	64
4.3.2	Identifikation von LRP1 als putativen AnxA1-Rezeptor mittels IP und anschließender MS-Analyse	66
4.4	Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion	68
4.4.1	LRP1-Expression in verschiedenen Zelltypen	68
4.4.2	Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion in Raw264.7 und primären Makrophagen mittels Co-IP	70
4.4.3	Validierung der Interaktion von LRP1 mit AnxA1 im ELISA	72
4.4.4	Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion im Ligand/Rezeptor Blot	74
4.5	Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Interaktion von LRP1 mit verschiedenen Annexinen	76
4.6	AnxA1 supprimiert die TLR-induzierte Aktivierung in LRP1 KO BMDM.....	83
4.7	AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-Aktivierung in BMDC	85
4.8	Die Efferozytose in Makrophagen und DC, sowie MEF erfolgt unabhängig von AnxA1	87
4.9	Die Phagozytose von Beads durch in BMDC und MEF aber nicht in BMDC ist abhängig vom AnxA1-LRP1 Komplex	89
5	Diskussion.....	93
5.1	Identifikation von LRP1 als neuen AnxA1-Rezeptor	93
5.1.1	Auswahl der Modellzelllinie	93
5.1.2	Optimierung der Expression von AnxA1-Mutanten mit pBpa-Inkorporation	94

5.1.3	Kritische Parameter der UV-Kreuzvernetzung zur Identifikation eines AnxA1-Rezeptors.....	96
5.1.4	Identifikation von LRP1 als neuen AnxA1-Rezeptor	98
5.1.5	LRP1 bindet auch an WT AnxA1 nach UV-Bestrahlung in Raw264.7 und primären Makrophagen.....	99
5.2	LRP1 bindet Calcium-abhängig verschiedene Annexine mit hoher Affinität.....	99
5.3	Die AnxA1-vermittelte Immunsuppression in Makrophagen und DC erfolgt LRP1-unabhängig	103
5.4	Die Efferozytose in professionellen und nicht- professionellen Phagozyten erfolgt AnxA1- und LRP1-unabhängig	105
5.5	Die Phagozytose von AnxA1-gekoppelten Beads ist LRP1-abhängig.....	108
5.6	Ausblick.....	110
6	Literaturverzeichnis	113
7	Abkürzungsverzeichnis	124
8	Abbildungsverzeichnis.....	126
9	Erklärung.....	127

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus einem angeborenen und einem adaptiven Teil und schützt den Organismus vor Infektionen und Pathogenen. Die Immunantwort umfasst verschiedene Phasen, die zur Kontrolle und Eliminierung der Infektion führen: (1) immunologische Erkennung des Pathogens, (2) Induktion und Regulation der Immunantwort und (3) Generierung eines immunologischen Gedächtnisses ¹. Als erste Verteidigungslinie agiert das angeborene Immunsystem, welches in der Lage ist mittels eines begrenzten Repertoires an spezifischen Rezeptoren vor allem konservierte, pathogene Strukturen zu erkennen ². Diese Art der Immunantwort ist evolutionär betrachtet sehr alter Mechanismus, der in fast allen Organismen und sogar Pflanzen wiederzufinden ist ³. Im Vergleich dazu stellt die adaptive Immunantwort ein eher evolutionär jüngeres System dar, das zudem nur in Wirbeltieren vorliegt. Diese Art der Immunantwort basiert auf der Generierung eines großen Repertoires an Antigen-spezifischen Lymphozyten, die in der Lage sind die Infektion direkt zu bekämpfen. Darüber hinaus kann das adaptive Immunsystem parallel ein immunologische Gedächtnis ausbilden, das den Organismus effizient vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger schützen kann ^{1,2}.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem zählen neben den Komplementfaktoren auch antimikrobielle Peptide und spezialisierte Zelltypen. Dazu gehören Makrophagen, Dendritische Zellen (*Dendritic cells*, DC), Granulozyten oder natürliche Killerzellen (NK), die alle aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark entstehen und in die Peripherie migrieren. Sie zirkulieren mittels Lymphe oder Blutstrom durch den Organismus und überwachen dabei permanent den Immunstatus. Sobald ein Pathogen die mechanischen Barrieren der Haut überwunden hat, kann der Erreger entweder direkt vom Komplementsystem oder durch NK-Zellen lysiert werden ^{1,4}.

Makrophagen sind in fast allen Geweben zu finden und ihre Hauptaufgabe besteht darin, Pathogene, sowie infizierte oder apoptotische Zellen zu erkennen und diese durch Phagozytose zu entfernen. Wurde ein Pathogen phagozytiert, kann eine Entzündungsreaktion, u.a. durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine ausgelöst werden, um weitere Immunzellen zu aktivieren und an den Ort der Entzündung zu rekrutieren ^{1,4}.

1 - Einleitung

DC verlassen das Knochenmark in einem unreifen Zustand mit Hilfe des Blutstroms, um sowohl in lymphoide als auch nicht-lymphoide Gewebe zu migrieren. Dabei überprüfen sie kontinuierlich den extrazellulären Raum auf Pathogene oder deren Proteine und nehmen durch Makropinozytose lösliche Proteine auf, gegen die sie eine Immunreaktion auslösen können. Genau wie Makrophagen sind DC potente Phagozyten, deren Hauptaufgabe jedoch nicht nur in der Aufnahme von Pathogenen, sondern vor allem auch in der Induktion adaptiver Immunantworten durch die Aktivierung von T-Zellen besteht ^{1,4,5}.

Die meisten bakteriellen Infektionen können durch das angeborene Immunsystem bereits ausreichend kontrolliert werden. Bei Viren oder intrazellulären Bakterien reicht diese erste Abwehr jedoch nicht aus und das adaptive Immunsystem wird zur Eliminierung des Pathogenes benötigt ¹.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunantwort wird von B- und T-Zellen vermittelt, die aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen. Im Gegensatz zur angeborenen Immunität verläuft diese Immunantwort antigenspezifisch, indem die B- und T-Zellen gezielt gegen einen bestimmten Erreger gerichtet sind. Die B-Zellen sind dabei für die Antikörperproduktion zuständig, während T-Zellen infizierte Zellen direkt eliminieren können. Basierend auf der somatischen Rekombination der verschiedenen Rezeptorgensegmente besitzt jeder T- und B-Lymphozyt einen spezifischen Rezeptor, der die Erkennung der pathogenen Struktur gewährleistet. Allerdings ist im Rahmen der somatischen Rekombination auch die Generierung von Rezeptoren möglich, die körpereigene Antigene erkennen. Zur Verhinderung einer Autoimmunreaktion existieren deswegen Toleranzmechanismen, die diese autoreaktiven Zellen eliminieren und in Kapitel 1.5 näher beschrieben werden ^{1,6}.

Im Anschluss an die Aktivierung des Lymphozyten erfolgt die massive Expansion dieses speziellen Klon um eine Vielzahl an Zellen zu generieren, die einen bestimmten Erreger effizient bekämpfen können. Nach erfolgreicher Eliminierung des Pathogens gehen fast alle dieser Effektorzellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) über, wodurch die zelluläre Homöostase aufrechterhalten wird. Einige Zellen differenzieren jedoch zu Gedächtniszellen, die bei einer Reinfektion mit demselben Erreger für eine spezifische und schnellere Immunantwort sorgen ¹.

1.1.3 Makrophagen & dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Makrophagen und DC zählen zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC). Beide sind in der Lage, durch Antigenpräsentation T-Zellen zu aktivieren und schlagen somit die Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Insbesondere DC sind als sensible Wächter des Immunstatus beschrieben. Sie entscheiden darüber, ob eine T-Zell-basierte Immunantwort ausgelöst wird und ob diese pro- oder anti-inflammatorisch verläuft. Zuerst müssen jedoch Pathogene oder apoptotische Zellen von den APCs erkannt und phagozytiert werden, um nach lysosomaler Degradation kurze Peptide dieser Erreger mittels *major histocompatibility complex* (MHC) I oder II Molekülen den CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden zu können und so die entsprechende T-Zellantwort zu induzieren ¹.

1.2 Endozytose, Phagozytose & Efferozytose

Ein essentieller Prozess im Rahmen von Immunantworten ist die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Makromolekülen (Endozytose), Partikeln (Phagozytose) oder von apoptotischen Zellen (Efferozytose) durch den Phagozyten. Auch wenn prinzipiell alle Zellen eines Organismus in der Lage sind zu phagozytieren, existieren professionelle Phagozyten (Makrophagen und DC) ^{1,7}. Diese zeichnen sich durch eine erhöhte Membranflexibilität und eine Vielzahl an spezialisierten Phagozytose-Rezeptoren aus, um auch größere Partikel schnell zu internalisieren und degradieren zu können ⁸. Die Phagozytose bezeichnet allgemein die Aufnahme von Partikeln bzw. Zellen, die größer als 1 µm sind und ist ein hoch konservierter Mechanismus von Bakterien und Schleimpilzen bis hin zu den Säugern. Der genaue Prozess der Phagozytose ist abhängig von dem zu internalisierenden Partikel. In der Regel bindet der Partikel an einen Zellmembranständigen Rezeptor des Phagozyts und die Membran stülpt sich aus, um den Partikel (Zellen oder Teilchen) zu umschließen und inklusive Rezeptor zu internalisieren. der apoptotischen Zelle in das Phagosom, in dem anschließend die finale Degradation erfolgt ^{9,10}.

1 - Einleitung

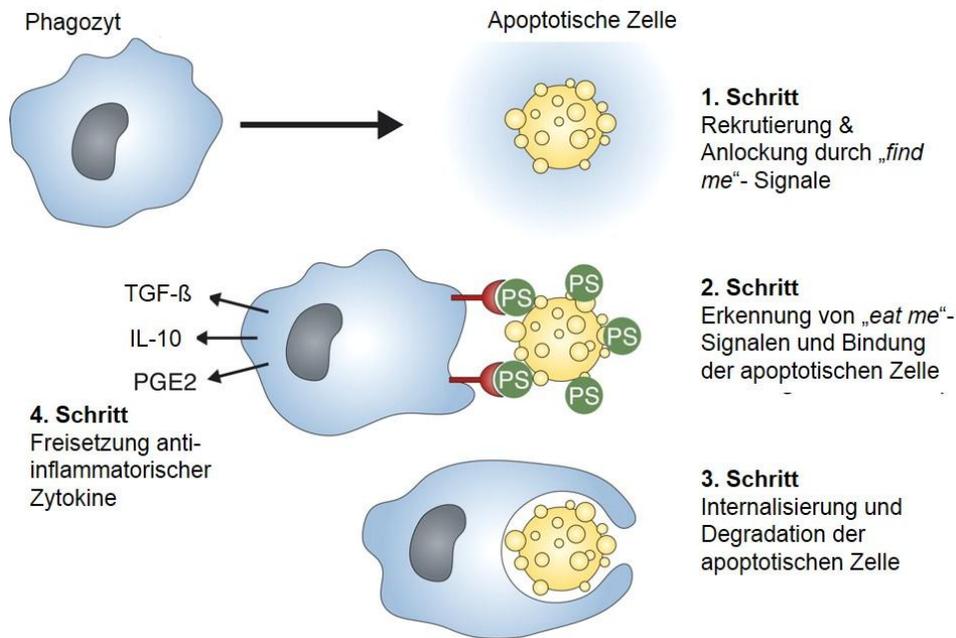


Abb. 1.1 - Verschiedene Schritte der Efferozytose. Apoptotische Zellen setzen *find me*-Signale frei und locken dadurch den Phagozyten an. Mittels spezieller Phagozytoserezeptoren kann dieser *eat me*-Signale auf der apoptotischen Zelle erkennen, binden und die Internalisierung durch Reorganisation des Zytoskeletts einleiten. Gezeigt ist hier beispielhaft die Erkennung von Phosphatidylserin (PS) auf der apoptotischen Zelle als *eat me*-Signal. Anschließend erfolgt die Prozessierung des internalisierten Zellkorpus durch die finale Degradation mittels Phagosoms und Lysosoms, und die Sekretion anti-inflammatorische Zytokine wie *tumor growth factor-β* (TGF-β), IL-10 oder Prostaglandin E2 (PGE2) wird induziert. (adaptiert und modifiziert von Ravichandran, JEM, 2010)

Die Efferozytose beschreibt die Internalisierung apoptotischer Zellen durch den Phagozyten ¹¹ und besteht aus vier wesentlichen Elementen ¹² (Abb.1.1): Zuerst muss der Phagozyt durch chemotaktische Faktoren, *find me*-Signale, rekrutiert werden, die von apoptotischen Zellen sezerniert werden. Befinden sich der Phagozyt und die apoptotische Zelle in unmittelbarer Nähe, spielen im zweiten Schritt, der direkten Interaktion zwischen apoptotischer Zelle und Phagozyt, von der apoptotischen Zelle ausgesandte „*eat me*“ oder „*don't eat me*“ Signale eine entscheidende Rolle. Das Verhältnis dieser beiden zueinander konträren Signale entscheidet letztendlich darüber, ob die Zelle aufgenommen wird oder nicht. Lebende, nicht zu phagozytierende Zellen besitzen deswegen insbesondere *don't eat me* Signale auf ihrer Oberfläche, die die Aufnahme verhindern. Der dritte Schritt der Efferozytose umfasst die Ausstülpung der Membran und damit verbundenen Internalisierung, der sich die Degradation im Phagosomen anschließt. Als Konsequenz dieses Prozesses werden im vierten und finalen Schritt anti-inflammatorische Zytokine wie TGF-β, IL-10 und PGE2 sezerniert.

1.2.1 Signaltransduktion der Phagozytose

Aufgrund von Entwicklungs- oder Alterungsprozessen, sowie der stetigen Gewebserneuerung, sterben pro Sekunde bis zu einer Millionen Zellen in unserem Körper. Weitere Beispiele für physiologisch auftretende apoptotische Zellen sind T-Zellen während der Selektion im Thymus, sowie beschädigte Epithelzellen des respiratorischen oder Verdauungstraktes oder Erythrozyten^{11,13}. Die meisten dieser Zellen sterben durch die Caspasen-vermittelte Apoptose. Trotz der hohen Frequenz an sterbenden Zellen sind im physiologischen Gleichgewichtszustand, auch „*steady state*“ genannt, aufgrund der sehr effizienten Beseitigungsmechanismen kaum apoptotische Zellen nachweisbar^{14,15}.

Essentiell für die Phagozytose ist die Unterscheidung zwischen ungefährlichen und gefährlichen, sowie körpereigenen und körperfremden Partikeln bzw. Zellen. Die Eliminierung apoptotischer Zellen wird in der Regel von professionellen Phagozyten wie DC und Makrophagen übernommen¹⁵. Sofern sich diese nicht in unmittelbarer Nähe befinden, können sie durch die Sekretion bestimmter „*find-me*“-Signale angelockt werden. Alternativ können auch nicht-professionelle Phagozyten die Beseitigung der apoptotischen Zellen übernehmen, jedoch mit geringerer Effizienz^{16,17}. Zu den Phagozytoserezeptoren zählen u.a. Fc-Rezeptoren, Komplementrezeptoren, „*Scavenger*“-Rezeptoren sowie Lektinrezeptoren (Abb. 1.2). Diese Rezeptoren sind in der Lage, Zellen aufgrund von Oberflächenstrukturen (Glykosylierungen, Lipide, bestimmte Proteinsequenzen oder Ladungen) zu unterscheiden und die Aufnahme der Zellen einzuleiten oder zu verhindern^{18,19}.

„*Find me*“- und „*keep out*“- Signale

Einige Gewebe, beispielsweise Epithelzellen im Darm, weisen eine hohe Zellerneuerungsrate und somit eine hohe Frequenz an apoptotischen Zellen auf. Daher ist es von großer Bedeutung, dass hier vor allem Phagozytose-fördernde Signale zur effektiven Beseitigung dieser Zellen entsandt werden. Zu den *find me*-Signalen gehören beispielsweise Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingosin-1-Phosphat (S1P), die Nukleotidtriphosphate ATP und UTP, sowie ein löslicher Teil von CX₃CL₁^{12,20–23}. Während für ATP, UTP und CX₃CL₁ bereits *in vivo* und *in vitro* gezeigt wurde, dass sie in der Lage sind Phagozyten anzulocken, bedarf es zur Untermauerung der *in vivo* Relevanz für LPC und S1P noch weiterer Studien^{12,22}. Generell wird die Phagozytose apoptotischer Zellen als ein anti-inflammatorisches Ereignis angesehen, welches zwar Monozyten, aber keine Neutrophile mit einbezieht¹⁵. Letzteres wird vermutlich durch das „*keep out*“- Signal

1 - Einleitung

Lactoferrin verursacht, welches von apoptotischen Zellen sekretiert wird. Lactoferrin blockiert die Migration von Neutrophilen ohne dabei die Rekrutierung von Monozyten zu beeinflussen und verschiebt das Verhältnis somit zugunsten einer anti-inflammatorischen Antwort ²⁴.

„Eat me“- und „don't eat me“- Signale

Die Unterscheidung von apoptotischen Zellen und lebenden Zellen basiert auf dem unterschiedlichen Expressionsmuster bestimmter Moleküle auf der Zelloberfläche. Die Exposition von Phosphatidylserin (PS) ist dabei bis heute das am Besten charakterisierte Signal auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle ²⁵. Derzeit sind verschiedene Rezeptoren beschrieben, die PS direkt binden. Dazu gehören „*brain-specific*“ Angiogenese Inhibitor 1 (BAI1), Stabilin-2 oder Mitglieder der TIM Familie (T-Zell Immunglobulin und Mucin-Domäne) TIM-1, TIM-3 und TIM-4 ²⁶⁻³⁰. Darüber hinaus stellt externalisiertes AnxA1 ein *eat me*-Signal auf apoptotischen Zellen dar, das direkt an PS bindet ³⁵. Mittels Brückenmoleküle können bestimmte Phagozytoserezeptoren jedoch auch indirekt an PS binden. Integrine binden beispielsweise über das von aktivierten Phagozyten-stammende *Milk fat globule-EGF factor 8 protein* (MFG-E8) an PS, oder die Mer Rezeptor Tyrosinkinase (Mer-TK) über das konstitutiv im Serum enthaltene *Growth arrest-specific 6* (Gas6) ³¹⁻³⁴. Brückenmoleküle der Collectin-Familie (SP-A, SP-D), Mannose-bindendes Lektin oder auch der Collectin-ähnliche Komplementfaktor C1q können dagegen Veränderungen im Glykosylierungs- oder Lipidmuster auf apoptotischen Zellen erkennen ^{15,36,37}. Die im Kontext der Efferozytose beschriebene Interaktion von externalisiertem Calreticulin mit LRP1 auf dem Phagozyten wird in Kapitel 1.7.3 näher beschrieben.

In der Literatur wurde bislang eine Vielzahl weiterer Phagozytoserezeptoren beschrieben (Abb. 1.2), die jedoch nach der initialen Veröffentlichung oftmals nicht weiter charakterisiert wurden.

Zur Differenzierung apoptotischer und lebender Zellen werden auch *don't eat me* Signale benötigt, die zu Phagozytose-inhibierenden Interaktionen führen. Eines dieser *don't eat me* Signale auf lebenden Zellen ist CD31, das bei Annäherung an CD31 auf dem Phagozyten zu einer homophilen Abstoßung führt und somit die Aufnahme verhindert ³⁸. Ein weiteres inhibitorisches Signal stellt die Interaktion von CD47 und SIRP α auf dem Phagozyten dar ³⁹. *Eat me*-Signale können auch gleichzeitig mit *don't eat me* Signalen präsentiert werden. Entscheidend ist dann die Relation bzw. Balance dieser entgegengesetzten Signale, die je nach Zellstatus differentiell reguliert wird.

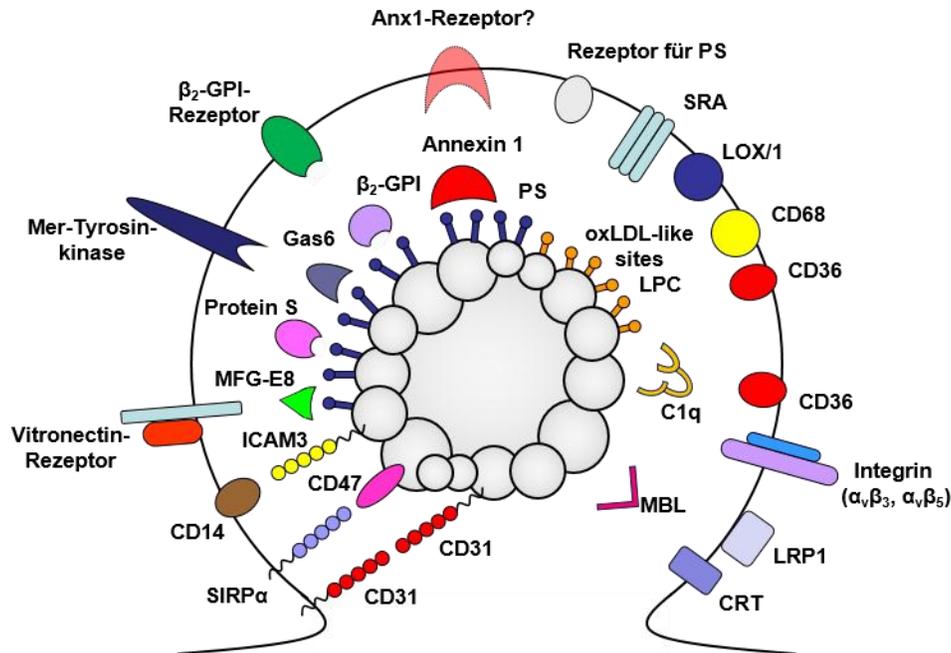


Abb. 1.2 - Übersicht der Phagozytoserezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen. (übernommen von Dörner, 2007, adaptiert und modifiziert von Savill *et al.*, Nat. Rev. Immunology, 2002)

1.2.2 Immunologische Konsequenzen der defekten Efferozytose

Der Prozess der Efferozytose wurde lange als ein nicht-aktiver immunologischer Vorgang angesehen, da keine pro-inflammatorischen Zytokine sezerniert werden. Seit Ende der 1990er Jahre hat sich diese Ansicht jedoch gewandelt, da gezeigt wurde, dass Efferozytose aktiv anti-inflammatorische Zytokine induziert oder sogar Toleranz und *in vivo* auslösen kann¹⁸.

Im Gegensatz zur Eliminierung pathogener Erreger oder nekrotischer Zellen resultiert die Beseitigung apoptotischer Zellen nicht in der Induktion einer pro-inflammatorischen Antwort und ist somit nicht immunogen. Dies beruht auf dem kontrollierten Ablauf der Apoptose, bei dem die Membranintegrität erhalten bleibt. Dadurch werden keine potentiell immunogenen Zellinhalte freigesetzt, die als Gefahrensignal fungieren und pro-inflammatorisch wirken⁴⁰. Die Interaktion einer apoptotischen Zelle mit dem Phagozyten löst die Immunsuppression bereits auf Transkriptionsebene der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , *granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor* (GM-CSF), Interleukin (IL)-12, IL-6, IL-1 β und IL-18 aus und induziert die Expression anti-inflammatorische Zytokine, u.a. IL-10 und TGF- β ⁴¹. Des Weiteren werden apoptotische Zellen im Phagozyten degradiert und die daraus resultierenden Selbst-Antigene den CD8⁺ T-Zellen über MHC I kreuzpräsentiert⁴², was einen essentiellen Vorgang zur Erhaltung der peri-

1 - Einleitung

pheren Toleranz darstellt. Eine massive Akkumulation apoptotischer Zellen kann zur unzureichenden Beseitigung der apoptotischen Zellen führen, da die zur Verfügung stehende Anzahl an Phagozyten zu gering ist ⁴³. Defekte in der Bindung, der Aufnahme oder der Prozessierung apoptotischer Zellen ermöglichen es den Zellen in die sekundäre Nekrose überzugehen. Dieses späte Stadium des Zelltods führt zur Freisetzung toxischer Zellinhalte und Autoantigenen, was anschließend zu einer Autoimmunreaktion führen kann.

Effiziente Efferozytose allein reicht jedoch nicht aus, um Mäuse vor Autoimmunität zu schützen. Die DNase2-defiziente Maus beispielsweise kann apoptotische Zellen phagozytieren, jedoch nicht die darin enthaltene chromosomale DNA verdauen und entwickelt infolgedessen rheumatoide Arthritis (RA). In diesem speziellen Fall resultiert die chronische Entzündung aus der Akkumulation von DNA in Makrophagen, die zu deren Überaktivierung und damit permanenten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt ⁴⁴. Im Kontext von Autoimmunerkrankungen wie SLE und RA spielen im Menschen nukleäre Antigene ebenfalls eine entscheidende Rolle. Diverse Studien belegen in diesem Zusammenhang, dass Defekte in der Efferozytose einen Ausgangspunkt dieser Krankheiten darstellen ¹⁶.

1.3 Antigenpräsentation

Im Anschluss an die Aufnahme extrazellulärer Antigene mittels Phagozytose oder Efferozytose, sowie Rezeptor-vermittelter Endozytose oder Makropinozytose, wird das Antigen prozessiert und den T-Zellen präsentiert. Die Präsentation kurzer Sequenzen des Antigens muss mittels MHC-Molekülen auf der Oberfläche professioneller APC (DC oder Makrophagen) erfolgen, da eine Aktivierung der T-Zellen durch lösliches Antigen nicht möglich ist. Exogene Antigene oder mittels Autophagie internalisierte Membran- oder Zytosolproteine gelangen in die Endosomen, werden dort weiter prozessiert und an MHC II Moleküle gebunden ^{1,45}. Hingegen werden endogene, falsch gefaltete oder virale Proteine, die nach Infektion in der Zelle exprimiert werden, mittels Proteasomen in kleinere Peptide gespalten und mit Hilfe der ABC Transportern TAP1 und TAP2 in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort werden diese Peptide erneut verkürzt und anschließend an MHC I Moleküle gebunden. Die resultierenden Antigen-MHC Komplexe (pMHC) werden nachfolgend zur Zellmembran transportiert und können dort von T-Zellen mittels T-Zellrezeptor gebunden werden. MHC I ist in allen kernhaltigen Zellen vorhanden und präsentierte Antigene werden hierbei von CD8⁺ T-Zellen gebunden. MHC II hingegen wird spezifisch von DC und Makrophagen exprimiert, weswegen diese professionelle Antigen-

präsentierenden Zellen exklusiv in der Lage sind $CD4^+$ T-Zell-Antworten zu induzieren ⁴⁵. Um eine effektive T-Zell-Antwort auszulösen, benötigen APC, mit Ausnahme von DC, jedoch zusätzlich zur Antigenpräsentation noch einen weiteren Stimulus. Dieser erfolgt über *Pattern Recognition Receptor* (PRR), wie z.B. Toll-like Rezeptoren oder *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) und die Bindung an deren Liganden. Dieser zweite Stimulus führt zur finalen Reifung und Aktivierung der APC durch Hochregulation der MHC II Moleküle und von co-stimulatorischen Rezeptoren wie CD80 und CD86. Darüber hinaus produzieren diese aktivierten APCs bestimmte Zytokine und Chemokine (u.a. TNF- α , IL-6, IL-12), sowie den Chemokinrezeptor CCR7 in DC, der sie zur Migration zu den T-Zellen in den Lymphknoten befähigt ⁵.

Antigen-Kreuzpräsentation

Einen speziellen Fall der Antigenpräsentation stellt die Kreuzpräsentation dar, die zum Erhalt der Selbst-Toleranz beiträgt. Dieser Prozess beschreibt die Fähigkeit der DC auch exogene Antigene mittels MHC I den zytotoxischen T-Zellen präsentieren zu können. Die Kreuzpräsentation wurde bislang einer speziellen DC Population zugeschrieben, wohingegen neuere Studien jedoch eher eine grundsätzliche Fähigkeit aller DC mit unterschiedlicher Effizienz in den Subpopulationen beschreiben. Die effizienteste Kreuzpräsentation erfolgt durch $CD8\alpha^+$ DC im murinen und die $CD141^+$ DC im humanen System ^{46,47}. Der intrazellulär ablaufende Mechanismus ist bislang nicht eindeutig geklärt und es stehen aktuell zwei Varianten zur Diskussion. Im kanonischen Signalweg werden die durch Endozytose aufgenommenen Partikel ins Zytosol freigesetzt und mittels Proteasom prozessiert, um anschließend im endoplasmatischen Retikulum auf MHC I geladen zu werden. Die zweite Variante beschreibt einen Proteasom- und Zytosol-unabhängigen Prozess, bei dem MHC I direkt im Endosom mit Peptiden beladen wird ⁴⁸. Beide Varianten konnten bislang nicht fundiert belegt werden und bedürfen weiterer Studien.

1.4 T-Zell-Aktivierung

Für die T-Zell-Aktivierung sind vor allem DC von großer Bedeutung, während Makrophagen eher eine untergeordnete Rolle spielen. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass DC in der Lage sind, direkt naive $CD4^+$ T-Zellen sowie zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren ⁵.

1 - Einleitung

In sekundär-lymphoiden Organen erfordert die T-Zell-Aktivierung drei von der DC ausgehende Signale: (1) Die T-Zell-Rezeptor (TZR)-Bindung an pMHC, (2) die Co-Stimulation durch Co-Rezeptoren der B7-Familie auf Oberfläche der DC und (3) ein durch die DC erzeugtes Zytokinmilieu⁴⁹. Das erste Signal hängt ausschließlich von der T-Zelle, der Spezifität ihres TZR sowie dem Kriterium ab, ob sie CD4 oder CD8 als Co-Rezeptoren für den TZR trägt. Die anderen beiden Signale hingegen sind DC-basiert. Die Qualität und Quantität der Signale entscheiden letztendlich über die Form der induzierten T-Zell-Antwort, da die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der DC verschiedene Proteine auf der T-Zelle binden können und dadurch unterschiedliche Effekte induzieren^{5,49}. Während eine Bindung an CD28 zum Überleben, zur Proliferation sowie zur IL-2 mRNA Stabilität in der T-Zelle führt, resultiert eine Bindung an den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 auf der T-Zelle in einer Unterdrückung der pro-inflammatorischen T-Zellantwort. Des Weiteren können DC weitere Mitglieder der B7 Familie, (PD-L1 & PD-L2) exprimieren, die durch die Bindung an PD-1 auf der T-Zelle deren Aktivierung negativ regulieren⁵⁰. Das für Signal 3 entscheidende Zytokinmilieu wird vor allem durch IL-12, sowie IL-6 oder TGF- β definiert. IL-12 und IL-6 führen hierbei zur Aktivierung der T-Zelle, während TGF- β zur Inhibition führt. Die exakte Feinabstimmung in der Kombination aller 3 Signale entscheidet letztendlich, ob die T-Zelle aktiviert wird und in welche Subpopulation sie sich differenziert⁵¹.

1.5 Immunologische Toleranz

Um Autoimmunreaktionen zu vermeiden, werden Kontrollmechanismen benötigt, die selbstreaktive T-Zellen frühzeitig eliminieren oder inaktivieren. Bereits zu Beginn der T-Zell-Entwicklung wird im Rahmen der zentralen Toleranz im Thymus weitgehend verhindert, dass autoreaktive T-Zellen überhaupt in die Peripherie gelangen. Ein Teil der autoreaktiven T-Zellen entkommt jedoch der strengen negativen Selektion im Thymus und wird in die Peripherie freigesetzt⁵². Zur Eliminierung verbliebener autoreaktiver Zellen werden daher Mechanismen der peripheren Toleranz benötigt^{52,53}.

1.5.1 Periphere Toleranz

Bei der peripheren Toleranzinduktion existieren verschiedene Kontrollmechanismen. Autoreaktive T-Zellen können durch Mechanismen der Ignoranz, Anergie, und Deletion inaktiviert oder beseitigt werden (Abb. 1.3). Des Weiteren kann eine Konversion von Effektor-T-Zellen (T_{eff}) in regulatorische T-Zellen (T_{reg}) erfolgen.

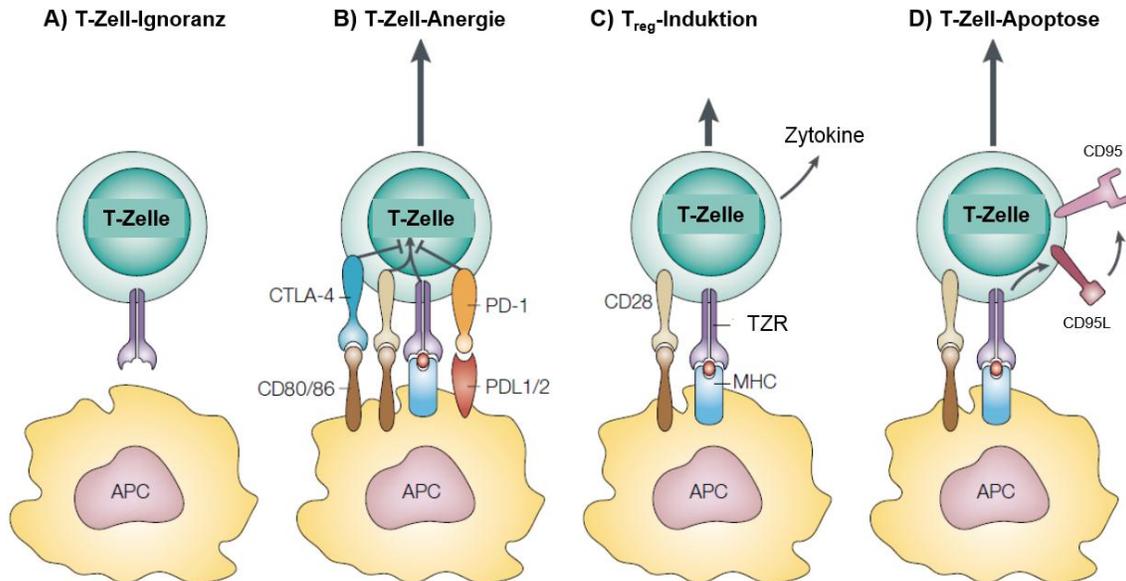


Abb. 1.3 - T-Zell-intrinsische Mechanismen der peripheren Toleranz. **A)** Ignoranz der T-Zelle bezüglich des Antigen. Das Antigen ist entweder für die T-Zelle nicht zugänglich, da es z.B. in immunprivilegierten Geweben vorliegt oder der Grenzwert für die Aktivierung nicht überschritten wird. **B)** Die T-Zelle bindet mit inhibitorischen Molekülen (CTLA-4 oder PD-1) an APC-basierte Moleküle (CD80/86, PD-L1/2) und wird in den Zustand der Anergie versetzt. **C)** Die T-Zelle wird durch die Bindung eines Autoantigens voll aktiviert, entwickelt sich jedoch aufgrund der von der APC sekretierten Zytokine (z.B. TGF- β oder IL-10) in eine regulatorische T-Zelle und verhindert somit aktiv eine Autoimmunreaktion. **D)** Autoreaktive T-Zellen können nach Kontakt mit einem Selbstantigen deletiert werden, indem sie durch Hochregulation von CD95L und dessen Signaltransduktion durch Bindung an CD95 den AICD (*activation induced cell death*) sterben. (adaptiert und modifiziert von Walker und Abbas, Nat. Rev. Immunology, 2002)

Im Fall der Ignoranz besitzt die T-Zelle keinen Zugang zu dem (Selbst-) Antigen. Beispiele hierfür sind die immunprivilegierten Bereiche wie das Auge oder das Hirn bedingt durch die Blut-Hirn-Schranke. Des Weiteren kann die Menge an Antigen unter dem Schwellenwert liegen, der überschritten werden muss, um eine T-Zell-Antwort zu induzieren^{54,55}. Bei der Anergie hingegen hat die T-Zelle zwar mittels TZR den Peptid-MHC-Komplex (pMHC) gebunden, bleibt jedoch dauerhaft inaktiviert, weil sie kein ein co-stimulatorisches Signal empfängt. Beim primären Kontakt bzw. der Aktivierung der T-Zelle erfolgt dies durch die Interaktion zwischen CTLA-4 auf der T-Zelle und Molekülen der B7-Familie (CD80/CD86) auf der Oberfläche APC. Zuvor tolerisierte T-Zellen, welche in periphere Gewebe migrieren, werden durch die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 in den Status der Anergie versetzt. Zudem blockiert die PD-1/PD-L1 Interaktion die Migration in die Peripherie und reguliert die Dauer des T-Zell-DC-Kontaktes, der für die volle Aktivierung von T-Zellen notwendig ist, negativ.⁵⁶⁻⁶⁰. Der anerge Status der T-Zelle äußert sich

1 - Einleitung

in einer Inhibition der T-Zell-Signaltransduktion und einer verminderten IL-2-Produktion, welche für die Proliferation von T-Zellen benötigt wird.⁵².

Die Konversion einer autoreaktiven Zelle in eine regulatorische T-Zelle ist ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion. Diese Umwandlung erfordert, genau wie die Anergie, die Interaktion mit einer tolerogenen DC, die diese Konversion mittels eines speziellen Zytokinmilieus forciert^{61,62}.

Letztendlich besteht die Möglichkeit, dass die T-Zelle durch Apoptoseinduktion („*activation induced cell death*“, AICD) deletiert wird. Nach wiederholter Bindung an MHC-präsentierte Autoantigene wird durch die Hochregulation von CD95L und dessen Interaktion mit seinem Rezeptor CD95 auf der T-Zelle die Caspasen-abhängige Apoptose aktiviert⁶³⁻⁶⁵.

1.5.2 Pro- und anti-inflammatorische APCs

DC sind eine heterogene Population APC, die sich in ihrer Entwicklung und in ihrem Reifungs- und Aktivierungsstatus unterscheiden und dadurch sowohl Immunität als auch Toleranz induzieren können⁶⁶. Unter „*steady state*“ Bedingungen, sprich im physiologischen Gleichgewichtszustand, können DC schnell auf verschiedene Stimuli reagieren, die darüber entscheiden ob die DC eine pro- oder anti-inflammatorische Antwort induziert⁶⁷. Die Fähigkeit, sowohl endogene als auch exogene Strukturen zu erkennen, verleiht der DC eine entscheidende Rolle an der Verknüpfungsstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Die tolerogene DC kann nach wie vor den T-Zellen Antigene mittels MHC präsentieren, jedoch die Balance zwischen co-stimulatorischen (CD80 & CD86) und co-inhibitorischen (PD-L1) Signalen zugunsten der inhibitorischen verschoben und induziert dadurch T-Zell-Anergie oder die Konversion zu regulatorischen T-Zellen. DC mit tolerogenem Phänotyp reagieren vermindert auf pro-inflammatorische Stimuli, wie z.B. Toll-like-Rezeptor Liganden oder CD40L. Allerdings kann die Migrationsfähigkeit durch die reduzierte Expression des c-c-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) vermindert sein, so dass die tolerogene DC nicht in sekundäre lymphoide Organe migrieren kann, um dort mit T-Zellen zu interagieren^{5,67}. Eine Übersicht der genannten, sowie weiteren Charakteristika einer tolerogenen DC ist in Abb. 1.4 dargestellt.

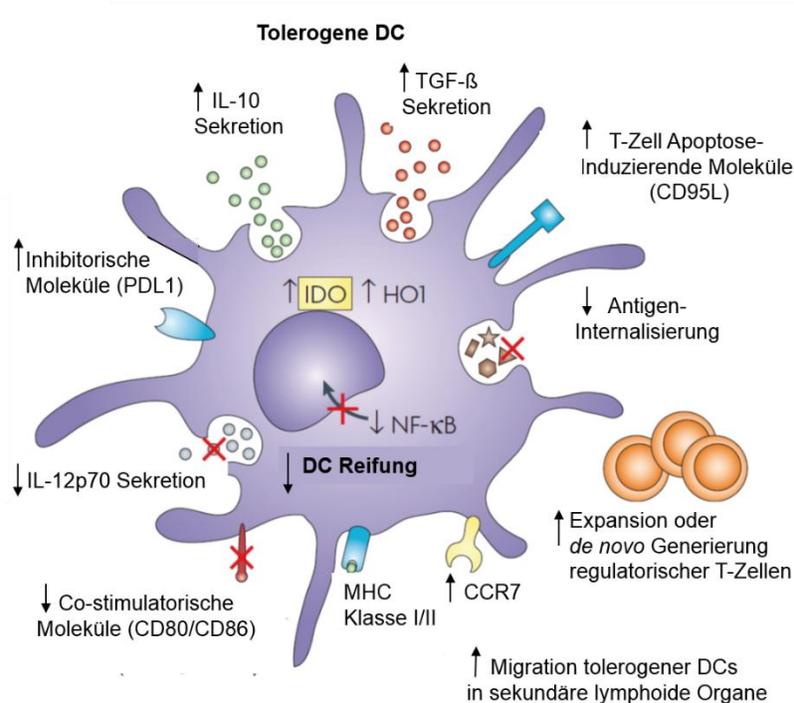


Abb. 1.4 - Charakteristika einer tolerogenen DC *in vitro*. Tolerogene DC besitzen je nach Art ihrer Entstehung, beziehungsweise Aktivierung, unterschiedlichste Phänotypen, welche folgende Charakteristika umfassen können: Herunterregulation von MHC I/II Molekülen, pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-12p70), co-stimulatorischen Molekülen (CD80/CD86), sowie der Antigen-Internalisierung und der Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). Im Gegenzug können Parameter wie die TGF- β und IL-10 Sekretion, inhibitorische Moleküle (PD-L1), Apoptose-induzierende Moleküle (CD95L), sowie die Expansion regulatorischer T-Zellen, die Migration in sekundäre lymphoide Organe und die IDO- und HO1-Expression hochreguliert werden. (adaptiert und modifiziert von Morelli & Thomson, Nature Reviews Immunology, 2007)

Einer der Schlüsselfaktoren dieser tolerogenen DC ist die inhibierte IL-12p70 Sekretion, die essentiell für die T-Zell-Aktivierung ist. Im Gegenzug dazu können anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-10 oder TGF- β hochreguliert werden, was wiederum zur Konversion von naiven CD4⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen führt. Intrazellulär wird die Reifung der DC unter anderem durch die Inhibition der Translokation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) in den Nucleus verhindert (Rutella, Danese, & Leone, 2006; Promotionsarbeit V. Jahndel, 2013).

Der Phänotyp tolerogener DC wurde bislang vor allem *in vitro* beschrieben. Der eigentliche Begriff der Toleranz ist jedoch ein Phänomen, dass das Zusammenspiel vieler Faktoren des Immunsystems, beziehungsweise die Interaktion zwischen DC und T-Zelle erfordert und deshalb *in*

1 - Einleitung

in vivo betrachtet werden sollte. Sowohl Kurts *et al.*, als auch Steinman *et al.* und Huang *et al.*, legten mit ihren Studien den Grundstein auf dem Gebiet der Toleranzinduktion *in vivo*. Kurts *et al.* transferierten Ovalbumin (OVA) -spezifische CD8⁺ T-Zellen in transgene Mäuse, die OVA in den β -Zellen des Pankreas exprimieren. Anhand dieses *in vivo* Modells konnten sie zeigen, dass der adaptive T-Zell-Transfer nicht zu der Auslösung einer Immunreaktion führte, sondern in der Proliferation und anschließenden Deletion der T-Zellen resultierte⁵⁵. Durch eine andere Studie von Huang und Kollegen konnte später belegt werden, dass für Toleranzinduktion insbesondere DC essentiell sind, da sie permanent Antigen von apoptotischen Epithelzellen zum Lymphknoten und somit in die unmittelbare Nähe von T-Zellen transportieren⁶⁹. Dies wurde später durch die Studien von Steinman untermauert, der als erster diese *steady state* DC analysierte. Dabei wurde deutlich, dass *steady state* DC effizient die Proliferation spezifischer CD4⁺ T-Zellen induzieren, diese jedoch nicht in Effektor-T-Zellen differenzieren, und selbst unresponsiv gegenüber einer Stimulation mit Freund's Adjuvanz bleiben. Anergie spielte in diesem Kontext eine untergeordnete Rolle⁷⁰.

Heutzutage ist es unumstritten, dass tolerogene DC ein Schlüsselfaktor der peripheren Toleranz *in vivo* sind und sie durch die Aufnahme und Präsentation von Selbstantigenen ihren Phänotyp so modifizieren können, dass eine T-Zell-basierte Autoimmunreaktion verhindert wird. Eine exakte Klassifizierung einer DC anhand eines genau definierten Musters an Oberflächenmarkern oder Zytokinen ist jedoch nicht möglich. Eine tolerogene DC definiert sich viel mehr über das Zusammenspiel mehrerer, aber nicht zwingend aller hier beschriebenen Oberflächenmarker und Zytokine.

Makrophagen & DC, redundante Funktionen?

Ähnlich wie bei den DC ist auch die Diversität der Makrophagen groß, was in einer Vielzahl unterschiedlicher Subtypen resultiert. Während DC vor allem sehr effiziente APCs darstellen, besitzen Makrophagen eine höhere Phagozytoseeffizienz. Viele der pro- und anti-inflammatorischen Signalwege sind jedoch weitgehend identisch⁷¹. Bis vor wenigen Jahren wurden Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems strikt von DC getrennt und als separater Zelltyp betrachtet. Neuere Studien beinhalten jedoch immer mehr Evidenzen, dass diese beiden Zelltypen nicht so verschieden sind und teilweise interagieren, um die Funktion der anderen zu vervollständigen⁷¹.

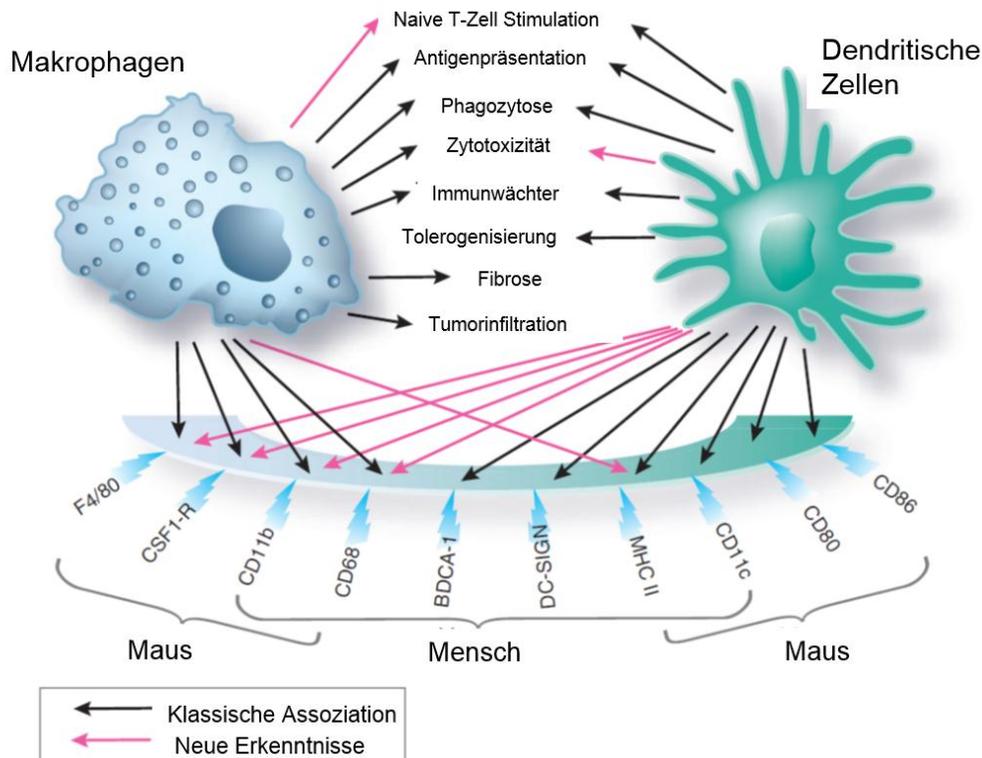


Abb. 1.5 - Übersicht der Charakteristika von DC und Makrophagen. Sowohl DC als auch Makrophagen sind in der Lage naive T-Zellen zu stimulieren, Antigen zu präsentieren und zu phagozytieren, sowie Zytotoxizität zu vermitteln. DC können darüber hinaus Toleranz induzieren, während Makrophagen Tumore infiltrieren und Fibrose induzieren können. Beide Zellarten besitzen gemeinsame Marker wie, F4/80, CSF1-R, CD11b, CD68 und MHC II. Exklusive Marker für DC sind BDCA-1, DC-SIGN, CD11c, CD80 und CD86. (adaptiert und modifiziert von Fehrenbach & Hughes, *Kidney International*, 2008)

Insbesondere Lin und Kollegen konnten schon 2005 anhand von *knock out*-Studien zeigen, dass der klassische Makrophagenrezeptor F4/80 essentiell für die Erhaltung antigenspezifischer peripherer Toleranz ist ⁷². Eine weitere Studie von Rothoefl und Kollegen konnte im direkten Vergleich zeigen, dass sowohl DC als auch Makrophagen eine immunologische Synapse mit naiven T-Zellen ausbilden können. DC sind darin lediglich effizienter, indem sie zur vermehrten Produktion von IL-2 und Interferon-gamma (IFN- γ) führen, während Makrophagen insbesondere zur IL-4-Sekretion führen ⁷³. Eine weitere Studie von Guan und Kollegen belegt die immunsuppressive Funktion von Makrophagen *in vivo*, indem sie zeigen, dass Makrophagen die Autoimmunität im Experimentellen-Autoimmun-Enzephalitis-Modell (EAE) verhindern ⁷⁴. Allerdings sollte sowohl bei diesen und anderen Studien beachtet werden, dass die Differenzierung zwischen APC, DC und Makrophagen oft nicht eindeutig ist und anhand eines einzelnen Markers nicht sicher auf einen ganz spezifischen Zelltyp geschlossen werden kann. Viele Veröffentlichungen zielen auf

1 - Einleitung

eine klare Differenzierung zwischen DC und Makrophagen ab. Bei genauerer Betrachtung sind die Grenzen jedoch nicht klar definiert und unumstritten ist nur, dass beide Zellen zu den mononukleären Phagozyten gehören. Eine Übersicht einiger grundlegender Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede von DC und Makrophagen ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

M1 & M2 Makrophagen

Analog zu den DC gibt es auch bei Makrophagen verschiedene Subtypen basierend auf unterschiedlichen Phänotypen und Funktionen. Im Gegensatz zu DC spricht man hier allerdings nicht von tolerogenen, sondern von klassisch aktivierten (M1) und alternativ aktivierten (AAM) beziehungsweise suppressiven Makrophagen (M2). Die M1-Makrophagen stehen dabei für pro-inflammatorische Makrophagen, die nach TLR oder IFN- γ Stimulation eine pro-inflammatorische Antwort durch die Sekretion von Zytokinen (u.a. TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23) auslösen. M2-Makrophagen hingegen wirken eher immunsuppressiv, tragen zur Wundheilung bei und induzieren anti-inflammatorische T-Zell-Antworten, indem sie Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 oder IL1Ra hochregulieren. Die beiden Subtypen werden im Wesentlichen durch die Expression von iNOS (M1) und Arginase-1 (M2), sowie durch Metalloproteinasen-Aktivität differenziert. Dennoch ist keiner dieser drei Marker ein exklusives Kriterium. Im direkten Vergleich sind vielmehr die relativen Konzentrationen und die Kombination weiterer Marker entscheidend für die Funktion⁷⁵⁻⁷⁷.

M2-Makrophagen werden in weitere Subtypen unterteilt (M2a-M2d), deren gemeinsames Merkmal die hohe Expression von Mannose-, Galactose- und Scavenger Rezeptoren ist. Nach Stimulation sezernieren sie verminderte Mengen IL-2 und IL-23 und sowie vermehrt IL-10. Auch im Chemokinemuster lassen sich klare Unterschiede zu M1-Makrophagen finden. Genau wie tolerogene DC induzieren M2-Makrophagen weitestgehend anti-inflammatorische T-Zell-Antworten und stellen somit die negative Rückkopplung zu der M1-induzierten pro-inflammatorischen T-Zell-Antwort dar⁷⁵⁻⁷⁷.

Abschließend ist festzuhalten, dass ein ausbalanciertes System aus sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen DC bzw. Makrophagen vorhanden sein muss, um Pathogene erfolgreich zu bekämpfen und gleichzeitig den Organismus vor Autoimmunerkrankungen zu schützen.

1.6 Annexin A1

Annexin A1 (AnxA1) gehört zur Superfamilie der Annexine, die evolutionär hoch konserviert ist und sowohl im Menschen und Tier als auch in Pflanzen vorkommt^{78,79}. Die Familie umfasst 12 Mitglieder (AnxA1-AnxA13), wobei AnxA12 ein Pseudogen darstellt. Der Name stammt vom lateinischen „*annexus*“ (Verbindung) ab und ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, dass Annexine an Membranen binden. Einige Annexine (AnxA1, AnxA2, AnxA4-7 und AnxA11) werden ubiquitär exprimiert, wohingegen AnxA9 selektiv nur in der Zunge oder AnxA13 in Dünndarm sowie einigen Lymphozyten zu finden ist^{80,81}. Generell handelt es sich bei den Annexinen um zytosolische Proteine, die mit Membrankomponenten oder Proteinen des Zytoskeletts interagieren können und dadurch die Motilität oder intrazelluläre Prozesse wie Endozytose beeinflussen⁸². Während der Apoptose kann AnxA1 aber auch an die Zelloberfläche translozieren, bindet dort an PS und dient eventuell als frühes *eat me*-Signal für Phagozyten^{35,83}.

AnxA1 ist besonders stark in Immunzellen, sowie in Zellen der Hirnanhangdrüse und des Hypothalamus und verschiedenen Epithelzellen exprimiert^{84,85}. Die höchste AnxA1-Expression weisen Neutrophile auf, bei denen AnxA1 bis zu 4% der Gesamtproteinmenge ausmacht. Auch in Monozyten sind größere Mengen AnxA1 detektierbar, während die Expression in Makrophagen, DC oder T-Zellen vergleichbar gering bzw. in B-Zellen gar nicht vorhanden ist^{85,86}. In der Regel exprimieren alle höheren Eukaryoten mehrere Annexine, jedoch gibt es kein Annexin, das in allen Zelltypen vorhanden ist. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Annexin-Expression gewebspezifisch und abhängig vom Entwicklungsstand reguliert wird⁸¹.

1.6.1 AnxA1-Struktur

Alle Mitglieder der Annexinfamilie besitzen einen kürzeren, sehr variablen N-Terminus, der einzigartig für jedes Annexin ist, sowie eine längere, hoch konservierte, C-terminale Kerndomäne. Die Kerndomäne besteht, mit Ausnahme von AnxA6, aus vier internen Wiederholungen und verfügt über acht für die Koordination an die Zellmembran relevante Calicumbindungsstellen (Abb. 1.6)⁸¹. Jede Wiederholung innerhalb der Kerndomäne ist ca. 70 Aminosäuren (AS) lang und bildet fünf α -Helices aus, die sich wiederum zu einer rechtsgewundenen Superhelix formieren. Durch Röntgenstrukturanalysen der meisten Säuger-Annexine konnte festgestellt werden, dass die hohe Konservierung vor allem in den ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturen wiederzufinden ist⁸⁷. Der N-Terminus kann posttranslational in Form von Phosphorylierung oder

1 - Einleitung

Myristoylierung modifiziert werden und wird aufgrund seiner Diversität zwischen den Familienmitgliedern für die differentielle Funktionen der jeweiligen Annexine beschrieben^{81,87}. Die erste Kristallstruktur des humanen AnxA1 wurde bereits 1993 von Weng *et al.* beschrieben und umfasste eine um die ersten 32 Aminosäuren verkürzte Version, die in der Gegenwart von Calcium kristallisiert wurde⁸⁸. Zehn Jahre später kristallisierten Rosengarth und Kollegen als Erste die Struktur des kompletten (porkinen) Proteins (Abb. 6) sowohl in der Anwesenheit als auch in der Abwesenheit von Calcium.

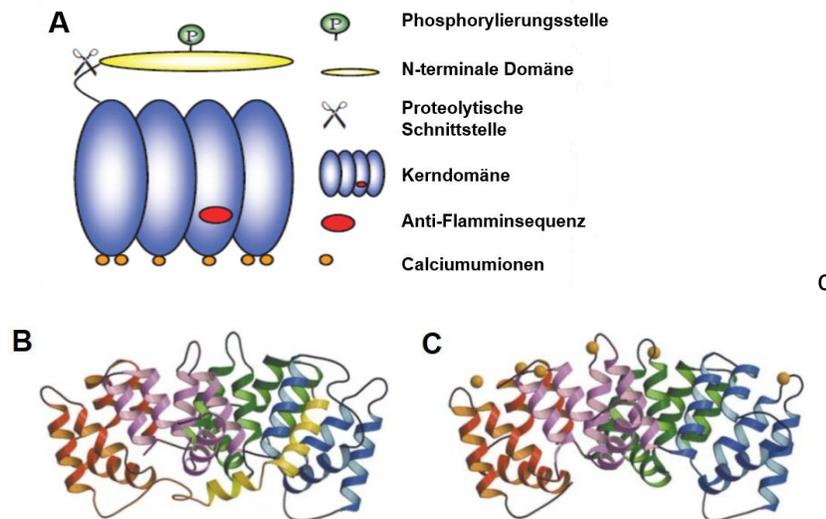


Abb. 1.6 - AnxA1 Struktur. **A)** Schematische Darstellung des AnxA1 Aufbaus. **B)** Die Tertiärstruktur des porkinen AnxA1 in Abwesenheit von Calcium. Der N-Terminus ist in gelb dargestellt und die 4 Einheiten der Kerndomäne in verschiedenen Farben (I: rot, II: grün, III: blau, IV= lila). **C)** Tertiärstruktur der Kerndomäne des humanen AnxA1 ohne den N-Terminus. Gebundene Calciumumionen sind als orangene Kugeln dargestellt. (adaptiert von Luecke/Rosengarth)

Dabei wurde erstmalig eine Calcium-abhängige Konformationsänderung von AnxA1 beobachtet. In Abwesenheit von Calcium formt die N-terminale Domäne zwei α -Helices, und die erste dieser Helices (Aminosäuren 2-12) klappt in die Kerndomäne. Dadurch ist der N-Terminus für post-translationale Modifikationen nicht mehr zugänglich. In Gegenwart von Calcium jedoch klappt dieser N-Terminus aus der Kerndomäne heraus und ist aufgrund einer sehr flexiblen Verbindungsstelle zum Kern relativ frei beweglich. In dieser Position ist er in der Lage, modifiziert zu werden oder Interaktionspartner zu binden^{89,90}.

1.6.2 Externalisierung und proteolytische Spaltung von AnxA1

Die Studien unserer Gruppe konnten zeigen, dass die AnxA1-Translokation an die Oberfläche früh-apoptotischer Zellen parallel zu der Exposition von PS erfolgt⁸³. Diese AnxA1-Translokation ist unabhängig von der Art der Apoptoseinduktion, benötigt jedoch Caspasen, Calciuminflux und ATP³⁵. Der genaue Translokationsmechanismus ist bislang ungeklärt, da sowohl AnxA1 als auch alle anderen Familienmitglieder kein für die Externalisierung benötigtes hydrophobes Signalpeptid besitzen und somit der klassische Sekretionsweg ausgeschlossen ist. Weitere Studien untermauern dies, da die Verwendung von Inhibitoren der klassischen Sekretion die AnxA1 Externalisierung nicht verhinderte. In Frage käme somit noch die unkonventionelle Proteinsekretion, die bislang für AnxA1 lediglich in der Hirnanhangdrüse nachgewiesen werden konnte⁹¹⁻⁹³.

Im Anschluss an die Externalisierung kann der N-Terminus von AnxA1 an verschiedenen Aminosäurepositionen proteolytisch durch Elastase oder Proteinase 3 gespalten werden, so dass unterschiedlich lange N-Termini freigesetzt werden⁹⁴. Das die Aminosäuren 2-26 umfassende Peptid (Ac2-26) wurde *in vivo* im Kontext einer akuten Entzündungsreaktion bereits mehrfach als anti-inflammatorisches Signal beschrieben⁹⁵.

Klinisch auffällig sind größere Mengen gespaltenen AnxA1 in Bronchialflüssigkeiten von Patienten, die an zystischer Fibrose oder anderen Lungenerkrankungen leiden. Diese erhöhten Mengen AnxA1 können in der Regel mit einer erhöhten Anzahl an Neutrophilen korreliert werden^{96,97}.

1.6.3 Immunologische Funktionen von AnxA1

Die Bedeutung von AnxA1 in Bezug auf immunologische Prozesse wurde schon 1980 von Blackwell und Kollegen beschrieben, die zeigen konnten, dass die anti-inflammatorische Aktivität von Glucocorticoiden zum Teil durch AnxA1 vermittelt wird. Glucocorticoide stimulieren sowohl die Expression als auch Sekretion von AnxA1 und verhindern die Eicosanoid-Synthese. Dies wird mit einer inhibierenden Wirkung von AnxA1 auf die sekretorische (sPLA2) und auf die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) in Verbindung gebracht, die die Freisetzung von Arachidonsäure aus Fettsäuren katalysiert^{92,98,99}.

Diverse Studien konnten zeigen, dass extrazelluläres AnxA1 in der Lage ist, verschiedene Arten von Immunzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu beeinflussen. Mittels intravenöser Injektion

1 - Einleitung

des N-Terminus (Ac2-26) oder des gesamten Proteins konnte *in vivo* gezeigt werden, dass AnxA1 die Neutrophilen- und Monozyten- Extravasation in entzündetes Gewebe hemmen kann, in dem es an Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPR) bindet und dadurch anti-inflammatorisch wirkt^{100,101}.

Im Kontext der Efferozytose wurde AnxA1 in verschiedenen Zelltypen möglicherweise als *eat me*-Signal beschrieben und verhindert, dass durch die Freisetzung intrazellulärer Gefahrensignalen eine pro-inflammatorische Antwort ausgelöst wird^{35,102}. Jedoch sind die Publikationen in Bezug auf den Status der apoptotischen Zelle, die relevanten AnxA1-Domänen, sowie den Phagozytoserezeptor kontrovers^{103–106}. Neben der Funktion von AnxA1 als *eat me*-Signal auf apoptotischen Zellen konnte durch die Inkubation mit rekombinantem AnxA1 gezeigt werden, dass AnxA1 darüber hinaus auch die Reifung der DC beeinflusst. Dies äußert sich in der Suppression der TLR-induzierten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, sowie der Herunterregulation der co-stimulatorischen Marker CD80 und CD86. Diese Immunsuppression konnte auf die Inhibition des NF- κ B Signalwegs zurückgeführt werden. Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-12) ist bereits auf transkriptioneller Ebene reduziert, wohingegen die Expression anti-inflammatorischer Zytokine unbeeinflusst bleibt. *In vivo* konnte außerdem gezeigt werden, dass Antigen-spezifische, zytotoxische T-Zell-Antworten in Abhängigkeit von AnxA1 inhibiert werden. Im Tumormodell war sowohl die Anti-Tumorantwort als auch die Tumorabstoßung nach Vakzinierung gegen Tumorantigene supprimiert, was AnxA1 einen immunsuppressiven Charakter in Bezug auf Antigenpräsentation zuweist⁸³.

Interessanterweise konnten D'Acquisto und Kollegen zeigen, dass der direkte Effekt von AnxA1 auf naive T-Zellen konträr zu dem Effekt auf DC und Makrophagen ist, da AnxA1 hier gezielt eine tendenziell pro-inflammatorische T-Zell-Antwort induziert. Anhand eines Kollagen-induzierten Arthritismodell (KIA) konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit AnxA1 während der Immunisierung mit Kollagen die Symptomatik deutlich verschlechtert, weil in diesem Mausmodell vor allem pro-inflammatorische T-Zell-Antworten eine Rolle spielen¹⁰⁷. D'Acquisto und Kollegen analysierten zudem die Funktion von endogenem AnxA1 anhand von T-Zellen aus der AnxA1-defizienten Maus. Sie konnten zeigen, dass die T-Zell-Aktivierung nach Stimulation (anti-CD3/CD28) vermindert ist und diese T-Zellen eher eine anti-inflammatorische T-Zell-Antwort auslösen, indem sie größere Mengen an IL-4 und IL-13 sekretieren. Das Fazit war somit, dass AnxA1 pro-inflammatorische T-Zell-Antworten forciert, während es aktiv anti-inflammatorische T-Zell-Antworten unterdrückt¹⁰⁸. Diese Erkenntnis wurde jedoch vor kurzem durch eine Studie von Yang und Kollegen in Frage gestellt, die das Gegenteil zeigte. Unter Ver-

wendung anderer Mausmodelle beschrieben Yang und Kollegen eine erhöhte antigen-induzierte Proliferationsrate von T-Zellen in Abhängigkeit von AnxA1. Darüber hinaus zeigten OVA-spezifische CD4⁺T-Zellen (OT-II Zellen) aus AnxA1-defizienten Mäusen eine generell höhere Proliferationsrate als Wildtyp OT-II Zellen, nachdem sie in Wildtypmäuse transplantiert wurden. Ausgehend von dieser Studie lässt sich anstatt der Differenzierung in eine bestimmte T-Zell-Antwort eher auf eine anti-inflammatorische Rolle für AnxA1 in Form von reduzierter CD4⁺ T-Zell-Aktivierung schließen¹⁰⁹. Insgesamt entwickelt die AnxA1-defiziente Maus keinen ausgeprägtem Phänotyp, was darin begründet sein kann, dass andere Annexine im Gegenzug hochreguliert werden und den AnxA1-Verlust kompensieren können, sofern redundante Funktionen vorliegen (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Lediglich die verstärkte Immunreaktion in verschiedenen *in vivo* Modellen zu akuten und chronischen Entzündungen, sowie die Überempfindlichkeit gegen sublethale Dosen von Endotoxin sprechen für einen immunologisch geprägten Phänotyp der AnxA1-defizienten Maus¹¹⁰⁻¹¹².

1.6.4 AnxA1-Rezeptoren

Bereits in den späten 90er Jahren entdeckten verschiedene Gruppen, dass AnxA1 mit Affinitäten im mikromolaren Bereich an die Oberfläche von Monozyten, Neutrophilen und Zellen der Hirnanhangdrüse binden kann. Diese Bindung war Calcium-abhängig, konnte gesättigt und mittels Vorbehandlung mit Trypsin inhibiert werden, was insgesamt auf einen membranständigen, proteinösen Rezeptor hinweist^{113,114}. Wenige Jahre später wurde festgestellt, dass es sich bei den identifizierten Rezeptoren um Mitglieder der Formyl-Peptid-Rezeptor (FPR) Familie handelte^{80,115}. Im Menschen umfasst diese G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR)- Familie drei Mitglieder: FPR1, FPR2 bzw. FPR-like-1 (FPR-L1), sowie FPR3 bzw. FPR-L2. In der Maus gestaltet es sich komplexer, da hier sechs Gene der FPR Familie identifiziert wurden¹¹⁶. Eines dieser Gene wird jedoch gar nicht und zwei andere nur in Zellen der Skelettmuskulatur exprimiert. Die verbleibenden drei Gene werden in Leukozyten exprimiert und heißen *fpr1*, *fpr-rs1* und *fpr-rs2*. *Fpr1* ist in diesem Fall das Analog zu FPR1, besitzt jedoch eine geringere Bindungsaffinität für den Hauptliganden der Rezeptorfamilie, N-formyliertes Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP)¹¹⁶. *Fpr-rs1* und *fpr-rs2* sind nahe verwandt mit dem humanen FPR-L1, während bislang kein murines Ortholog zu dem humanen FPR-L2 beschrieben wurde. Die Bindung dieser Rezeptoren an fMLP bakteriellen oder mitochondrialen Ursprungs führt zur Leukozytenrekrutierung an den Ort der Infektion bzw. des entzündeten Gewebes¹¹⁶. Funktionell betrachtet lässt dies die FPR als AnxA1-Rezeptor in Frage kommen, da auch AnxA1 die Rekrutierung von Leukozyten beein-

1 - Einleitung

flusst^{117,118}. Eine Studie mit FPR1 bzw. Fpr-rs2-defizienten Mäusen konnte dies bestätigen, da die AnxA1-vermittelte Inhibition der Leukozytenmigration und die Bindung an Monozyten in diesen Mäusen teilweise reduziert war¹¹⁵. Darüber hinaus konnte der AnxA1-Effekt mittels des FPR-Inhibitors tBoc-Met-Leu-Phe (Boc1) in einem Peritonitis Mausmodell geblockt werden. Interessanterweise ist die Bindung von AnxA1 an den FPR in Fpr1-defizienten Mäusen jedoch nur teilweise inhibiert, was darauf schließen lässt, dass noch weitere AnxA1-Rezeptoren existieren.

Einen essentiellen Punkt bei der AnxA1-FPR Interaktion stellt die Frage dar, welcher Bereich des AnxA1-Moleküls für die FPR-Bindung und die dadurch induzierten anti-inflammatorischen Effekte verantwortlich ist. Perretti *et al.* haben in diversen Studien gezeigt, dass das N-terminale Peptid (Ac2-26) in der Lage ist, die beschriebenen Effekte zu vermitteln, obwohl das komplette Protein, sowie der N-Terminus eine 10.000-100.000-fach geringere Bindungsaffinität als fMLP aufweisen^{80,117,119-121}. Die Generalisierung der bislang genannten Effekte für alle FPR-exprimierenden Zellen bleibt jedoch fraglich. Außerdem stellt sich die Frage, ob FPRs eine redundante Funktion für die AnxA1 aufweisen oder spezielle FPRs für den immunsuppressiven Effekt benötigt werden. Beispielweise konnte in Monozyten gezeigt werden, dass die Inkubation mit dem N-terminalen Peptid (Ac2-26) über Aktivierung der Phospholipase D, der Janus-Kinasen und des MAP-Kinasen Signalwegs zur Inhibition der LPS-induzierten TNF-Sekretion führt, indem es die STAT3-Translokation in den Nukleus verhindert. Diese Effekte konnten mittels des pan-FPR Antagonisten tBoc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc2) aufgehoben werden¹²². Während Neutrophile nur FPR1 und FPR2 exprimieren, sind in Monozyten alle drei FPRs exprimiert und können alle gleichermaßen vom N-terminalen AnxA1-Peptid aktiviert werden. Im Gegensatz dazu exprimieren humane DC nur FPR1 und FPR3 und verlieren FPR1 sogar noch während des Reifungsprozesses^{117,123-125}. Dennoch bleiben sie voll responsiv für die AnxA1-vermittelte Suppression der TLR-induzierter Zytokinsekretion oder der Regulation von co-stimulatorischen Oberflächenmarkern⁸³.

Entscheidend ist jedoch, dass unserer Gruppe zeigen konnte, dass der immunsuppressive Effekt weder auf humanen noch auf murinen DC durch Boc1 und/oder Boc2 blockierbar ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass das N-terminale Peptid für den suppressiven Effekt auf die DC-Aktivierung irrelevant ist, da N-terminal deletiertes AnxA1, und somit allein die Kerndomäne die Immunsuppression induzieren kann (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Somit stellt sich in DC die berechnete Frage nach einem weiteren, derzeit unbekanntem AnxA1-Rezeptor, der nicht zur FPR Familie gehört und ebenfalls anti-inflammatorisch wirkt.

1.6.5 AnxA1 und Krankheiten

In der AnxA1-defizienten Maus konnte nur ein sehr milder Phänotyp beobachtet werden und auch im Menschen ist bislang keine Krankheit bekannt, für die genetische Defekte der Annexin-Expression kausativ sind^{82,111,126,127}. Dennoch konnten verschiedene Studien zumindest einen AnxA1-Beitrag zu bestimmten pathophysiologischen Verläufen nachweisen¹²⁸. Besonders im Hinblick auf Tumorerkrankungen lassen sich die Erkenntnisse aufgrund der Heterogenität verschiedener Tumoren nur schwer generalisieren, da die Expression verschiedener Annexine je nach Art des Tumors sowohl erhöht als auch reduziert sein kann¹²⁸. Des Weiteren sind viele dieser Studien rein deskriptiv und liefern keinen direkten Zusammenhang oder eine Funktion der verschiedenen Annexine in diesen Tumoren. Die meisten Studien basieren lediglich auf Expressionsanalysen im Microarray-Format ohne zellbiologische Validierung der Funktion. Darüber hinaus wird der genaue Ursprung des Annexins (endo- oder exogen) unzureichend geklärt und der Tumor oft isoliert, und somit nicht im Zusammenspiel mit umgebenden Gewebe oder dem Immunsystem, betrachtet^{129–132}.

Eine veränderte AnxA1-Expression oder die Akkumulation von Spaltungsprodukten wurden unter anderem auch im fragilen X-Syndrom, der Weber-Christian-Krankheit, dem familiären mediterranen Fieber sowie bei zystischer Fibrose und anderen Lungenerkrankungen nachgewiesen^{96,97,133,134}. Die genaue AnxA1-Funktion im Rahmen dieser Krankheiten ist bislang jedoch nicht geklärt.

In Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie SLE, RA oder chronischer Darmentzündung wurden Autoantikörper gegen AnxA1 nachgewiesen. Diese anti-AnxA1-Antikörper könnten gegebenenfalls den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen und als diagnostischer Marker für die Progression dieser Autoimmunerkrankungen genutzt werden^{135,136}.

Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Annexine möglicherweise redundant wirken (Promotionsabreit B. Linke, 2011), ist es allerdings nicht überraschend, dass eine Korrelation der genannten Erkrankungen mit der Expression eines einzelnen Annexins sehr schwierig ist.

1.7 Low density lipoprotein receptor-related protein 1

Das *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) wurde ursprünglich nahezu zeitgleich von zwei unabhängigen Gruppen beschrieben. Herz und Kollegen entdeckten den Rezeptor im Zusammenhang mit Lipoproteinstoffwechsel und Chylomikronenaufnahme in der Leber¹³⁷, während Ashcom *et al.* und Moestrup *et al.* einen hepatischen Rezeptor identifizierten, der den Proteinaseinhibitor α 2-Makroglobulin komplexiert und mittels Endozytose aus dem Blut entfernt^{138,139}. Anhand von Sequenzierungen der identifizierten Rezeptoren wurde kurze Zeit später festgestellt, dass es sich bei dem α 2-Makroglobulin-Rezeptor und LRP1 um ein und dasselbe Protein handelt¹⁴⁰. LRP1 wird in diversen Geweben exprimiert und spielt nicht nur für den Fettstoffwechsel, sondern auch bei der Beseitigung von Amyloid- β im Gehirn eine wichtige Rolle. Darüber hinaus gewinnt LRP1 zunehmend an Bedeutung im Zusammenhang mit dem Immunsystem durch die Beteiligung an phagozytotischen Prozessen¹⁴¹. Studien LRP1-abhängiger Funktionen werden durch die Tatsache erschwert, dass die LRP1-defiziente Maus embryonal lethal ist, was die essentielle Bedeutung von LRP1 bereits während der Embryonalentwicklung unterstreicht¹⁴².

1.7.1 LRP1-Struktur und -Liganden

LRP1 gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren, die mehrere strukturell homologe Rezeptoren umfasst. Sieben Mitglieder, darunter der *very low density lipoprotein* Rezeptor (VLDL Rezeptor) oder der ApoE-Rezeptor 2, sind eng verwandt mit dem LDL-Rezeptor, während LRP5, ebenso wie LRP6 oder LRP11 größere strukturelle Unterschiede aufweisen. Alle Rezeptoren dieser Familien besitzen einen modularen Aufbau aus Cystein-reichen, Komplement-ähnlichen Wiederholungen (*complement repeats*, CR), EGF-Bindungsdomänen, β -Propellerdomänen und einer transmembranen sowie einer zytosolischen Domäne¹⁴¹ (Abb. 1.7). LRP1 besteht aus einer 515 kDa großen α -Kette, in der sich CR, EGF-Wiederholungen und β -Propellerdomänen abwechseln, und aus einer β -Kette, die sich aus dem transmembranen und dem zytosolischen Teil zusammensetzt. LRP1 wird als einkettiges Vorläuferprotein translatiert, welches anschließend durch das Enzym Fumarase im Cytosol in α - und β -Kette gespalten und somit als zweikettiger Rezeptor an die Zellmembran transportiert wird. Die beiden Ketten sind über bislang nicht eindeutig charakterisierte, nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden¹⁴³.

LRP1 besitzt eine große Anzahl CR, die als Liganden-bindende Domänen bezeichnet und in die vier Cluster innerhalb der α -Kette unterteilt werden. Die meisten der über 40 Liganden binden in Cluster II und IV ¹⁴¹. Die Funktionen der EGF- und β -Propellerdomänen wurde mittels Deletionsstudien analysiert, in denen gezeigt werden konnte, dass in Abwesenheit dieser Domänen endozytierte Liganden in der sauren Umgebung des Endosoms nicht mehr freigesetzt werden konnten.

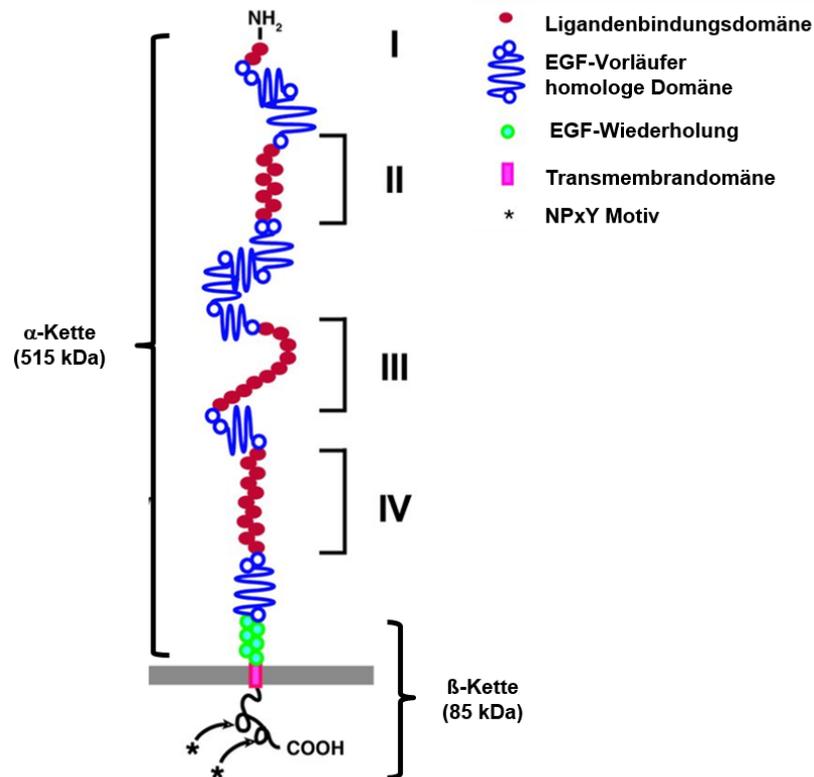


Abb. 1.7 - Schematische Darstellung der LRP1-Struktur. Die vier Bindungsdomänen der α -Kette sind mit I-IV gekennzeichnet. Die Sternchen stehen für die beiden Phosphorylierungsstellen (NPxY). (adaptiert und modifiziert Herz & Strickland, JCI, 2001)

An die transmembrane Domäne schließt sich ein cytosolischer Teil mit zwei NPxY Motiven an, wobei das terminale dieser Motive nach Stimulation mit PDGF- β Tyrosin-phosphoryliert werden kann. Darüber hinaus sind diverse Adaptormoleküle für den cytoplasmatischen Teil beschrieben ¹⁴¹. LRP1 kann sowohl extrazellulär als auch intramembranös proteolytisch gespalten werden. In Makrophagen wird LRP1 infolge von LPS-Stimulation durch die Metalloproteinase ADAM17 gespalten. Daraus resultiert eine lösliche, extrazelluläre LRP1-Form (sLRP1), die den NF- κ B Signalweg durch Aktivierung des p38/MAP-Kinase Wegs aktiviert ¹⁴⁴. Die intrazelluläre

1 - Einleitung

Domäne (IZD) wird mittels γ -Sekretase gespalten, verhindert die Translokation des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors IRF3 in den Nukleus und inhibiert somit entzündungsfördernde Prozesse¹⁴⁵. LRP1 kann somit sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken.

1.7.2 LRP1 Funktion

LRP1 & Phagozytose

Die große Liganden-Diversität, sowie die endozytotische Funktion von LRP1 sind die Basis der Bedeutung dieses Rezeptors in dem Prozess der Phagozytose. Die Mechanismen der Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen sind von der Fliege bis zum Menschen hoch konserviert. In diesem Kontext bedeutsame Rezeptoren wurden sowohl in *C. elegans* als auch in *Drosophila melanogaster* identifiziert. In *C. elegans* wurde beispielsweise der LRP1-ähnliche Transmembranrezeptor CED-1 als Phagozytoserezeptor beschrieben, der bislang unbekannte Signale auf apoptotischen Zellen erkennt¹⁴⁶. Infolgedessen rekrutiert er das Adaptorprotein CED-6 an das NPxY Motiv des cytoplasmatischen Teils, das wiederum das Rac-ähnliche CED-10 bindet und zur Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts führt, einem essentiellen Schritt der Phagozytose^{147,148}. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit von LRP1 und dessen Fähigkeit das Adaptorprotein GULP, das humane Homolog zu CED-6, zu rekrutieren, ist es naheliegend, dass auch LRP1 für die Phagozytose apoptotischer Zellen von Bedeutung ist. Dies konnte durch Studien mittels eines chimären Rezeptors untermauert werden, der die zytoplasmatische Domäne von LRP1 und den extrazellulären Teil von CD2, einem T-Zell Oberflächenprotein, beinhaltet. CD2 ist in der Lage, Schafserythrozyten zu binden und zu internalisieren, was in den Studien jedoch nur dann erfolgte, wenn der chimäre Rezeptor mit der LRP1 Zytosoldomäne ausgestattet war¹⁴⁹.

Calreticulin/LRP1 vermittelte Phagozytose

Untersuchungen in Bezug auf die Bedeutung von LRP1 für Phagozytose basieren oft auf der Interaktion von LRP1 mit Calreticulin (CRT). In den initialen Studien von Ogden *et al.* wurde gezeigt, dass LRP1 auf Phagozyten einen Komplex mit membranständigem CRT formt und dies zur Internalisierung von C1q- oder MBL-opsonierten Zellen führt¹⁵⁰. C1q und MBL, sowie die Kollektine SP-A und SP-D, sind als *eat me*-Signale beschrieben, die die phagozytotische Funk-

tion von professionellen Phagozyten verstärken ¹⁵¹. Da CRT keine Transmembrandomäne besitzt, ist bislang jedoch noch unklar, wie und ob es überhaupt an die Zelloberfläche gelangt, um dort mit LRP1 auf dem Phagozyten zu interagieren. Ogden und Kollegen erweiterten diese Studien auf die Phagozytose von apoptotischen Jurkat T-Zellen durch humane Makrophagen und wiesen mittels LRP1- und CRT-blockierender Antikörper die Beteiligung dieser beiden Proteine an der Phagozytose nach ¹⁵⁰.

Abhängig von den erkannten Signalen und den jeweilig vorliegenden Komplexen wird im Anschluss an die Internalisierung darüber entschieden, ob eine pro- oder anti-inflammatorische Antwort ausgelöst wird. Gardai und Kollegen beschreiben diesbezüglich ein Modell, in dem *in vivo* die Konsequenz der LRP1-vermittelten Phagozytose von den *Defense*-Kollagenen abhängt. *Defense*-Kollagene fungieren hierbei als Überwachungsfaktoren, die sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Signalwege aktivieren können ³⁹. Unter *steady state* Bedingungen können die Lungenkollektine SP-A und SP-D mittels ihrer Kopfreionen das inhibitorische Signalprotein SIRP α binden. Hierdurch aktivieren sie die Tyrosinphosphatase SHP-1 und blockieren die durch p38 und src-Kinasen vermittelte pro-inflammatorische Antwort. Liegt jedoch eine Infektion oder Verletzung der Lunge vor, können SP-A und SP-D Fremdorganismen oder Zellreste mit ihren globulären Kopfreionen binden, während das andere Ende dieser Proteine mit LRP1/CRT interagiert und die Phagozytose einleitet (Abb. 1.8) ¹⁵².

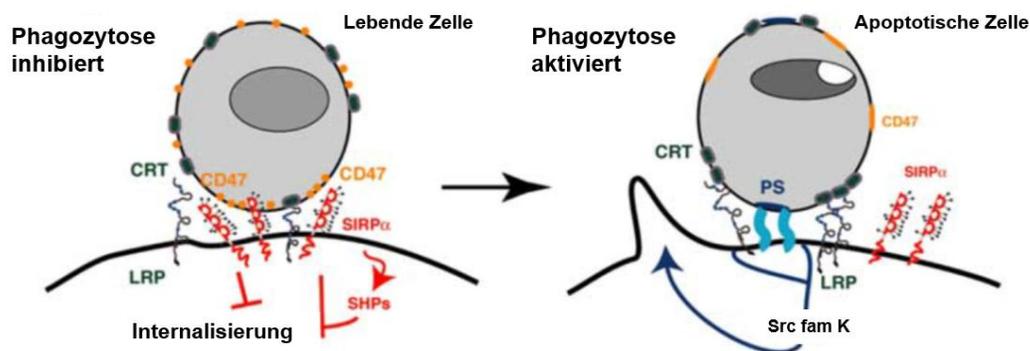


Abb. 1.8 - LRP1 bindet Calreticulin (CRT) auf apoptotischen Zellen. Schematische Darstellung der veränderten Oberflächenmoleküle im Verlauf der Apoptose. Trotz Bindung von LRP1 auf dem Phagozyten an CRT an der lebenden Zelle verhindert die CD47-SIRP α Interaktion die Internalisierung der lebenden Zelle. Geht die Zelle in die Apoptose über, erhöht sich die Menge an membranständigem CRT und die Interaktion mit LRP1 wird verstärkt. Durch externalisiertes PS kann die Bindung des Phagozyten potenziert werden, und der CD47-SIRP α Komplex wird dissoziiert und somit inaktiviert. (adaptiert und modifiziert von Gardai *et al.*, Cell, 2005)

1 - Einleitung

Somit wird nicht mehr das inhibitorische SIRP α gebunden, sondern der pro-inflammatorische p38-Signalweg induziert, der letztendlich zur Hochregulation von NF- κ B abhängigen pro-inflammatorischen Signalen führt. Zu betonen ist hierbei jedoch, dass die Bedeutung von LRP1 in diesem Kontext nur indirekt gezeigt wurde, in dem blockierende Antikörper oder Liganden-Antagonisten verwendet werden. Der genaue Einfluss von LRP1 als phagozytierender Rezeptor auf Entzündungsprozesse wird Gegenstand zukünftiger Studien sein und wird vor allem mittels gewebsspezifischer *knock-out*-Mäuse analysiert werden. Die Makrophagen-spezifische LRP1 *knock out*-Maus wurde bereits von zwei Gruppen für funktionelle Studien im Kontext von Atherosklerose analysiert ^{153,154}.

In beiden Fällen entwickelten die LRP1-defizienten Mäuse eine deutlich ausgeprägtere Atherosklerose, während die Aufnahme von Lipoproteinen aus dem Serum unverändert war. Darüber hinaus konnte mit *in vitro* differenzierten Makrophagen aus diesen Mäusen gezeigt werden, dass die LRP1-Defizienz zur erhöhten TNF- α Sekretion infolge von LPS-Stimulation führte ¹⁵³. Gemeinsam verdeutlichen diese Daten die Relevanz von LRP1 im Rahmen der Immunregulation und geben Anlass zur detaillierten Analyse der zugrunde liegenden LRP1-abhängigen Mechanismen.

LRP1 und Kreuzpräsentation

Im März 2014 veröffentlichten Subramaniam *et al.* eine Studie, die erstmals LRP1 als Efferozytose-Rezeptor und dessen Bedeutung für Antigen-Kreuzpräsentation beschreibt. Die bereits bekannten Efferozytoserezeptoren CD36, av β 5 und av β 3 spielten in dieser Studie keine Rolle für die Antigenkreuzpräsentation in DC ¹⁵⁵. Die Rezeptoren Axl und Tyro3 gehören zur TAM-Rezeptorfamilie, und DC aus der Axl/Tyro3^{-/-} Maus weisen *in vitro* eine defekte Efferozytose auf ¹⁵⁶. Die *in vivo* Relevanz dieser Rezeptoren, insbesondere auch deren Einfluss auf die Kreuzpräsentation, blieb jedoch bis zu dieser Veröffentlichung ungeklärt. Subramaniam *et al.* identifizierten im Rahmen der genannten Studie einen Multiproteinkomplex aus Axl, LRP1 und Ranbp9, in dem jedes Protein eine andere, aber essentielle Aufgabe erfüllt. Die Studie zeigt, dass Axl lediglich für die Bindung apoptotischer Zellen benötigt wird, während LRP1 für die Internalisierung der apoptotischen Zelle verantwortlich ist. Ranbp9 scheint für die Axl-LRP1-Komplexbildung von essentieller Bedeutung zu sein, da Ranbp9-defiziente Zellen eine verminderte Efferozytoserate aufweisen. Des Weiteren konnten Subramaniam *et al.* eine reduzierte Efferozytoserate in Axl und LRP-1-defizienten DC nachweisen, wobei die LRP-1 defizienten DC

aber noch in der Lage waren apoptotische Zellen zu binden. Die verminderte Efferozytose führte letztendlich auch zu einer verminderten Kreuzpräsentation, welche sowohl *in vivo* mittels des OVA und OT-I Systems (OVA-spezifische MHC I Zellen) gezeigt werden konnte, als auch anhand eines HSV-1 Infektionsmodells und Herpes Simplex Virus-Peptid spezifischen T-Zellen. Da Gas6 bereits als Ligand für Axl beschrieben wurde¹⁵⁷, wurde gingen Subramaniam *et al.* nicht weiter auf mögliche Liganden ein. Dadurch bleibt auch die Frage ungeklärt, ob auch LRP1 eine Liganden-Interaktion für die Internalisierung benötigt oder ob die Nähe und die Verbindung zu Axl über das Adaptorprotein Ranbp9 in diesem Fall ausreicht, um apoptotische Zellen aufzunehmen.

LRP1 und Krankheiten

LRP1 spielt unter anderem im Gehirn eine große Rolle, wo dieser Rezeptor dafür zuständig ist, ApoE zu binden und dadurch Cholesterol zu internalisieren¹⁴¹. Cholesterol ist essentiell für den Stoffwechsel von Neuronen und Cholesterolmangel wird mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht. Im Kontext der Alzheimer Pathophysiologie wird LRP1 außerdem eine wichtige Funktion zugeschrieben, da LRP1 die Amyloid-Plaquebildung verhindert, indem es an der Blut-Hirnschranke Amyloid- β bindet und internalisiert^{158,159}. Des Weiteren existieren Studien, die die Rolle von LRP1 in multipler Sklerose analysieren und die zeigen, dass LRP1 essentiell für die Beseitigung der Myelinabbauprodukte ist, und deren Akkumulation verhindert^{160,161}. In der Leber ist LRP1 im Wesentlichen als endozytotischer Rezeptor von Bedeutung, um atherogene Faktoren aus dem Blutstrom zu entfernen. Somit ist LRP1 in der Leber genauso wie im Herz essentiell, um eine Ansammlung dieser Faktoren und somit das Entstehen von Atherosklerose zu verhindern¹⁴¹.

Während LRP1 im Hirn, in der Leber und im kardiovaskulären System lediglich in Bezug auf die Internalisierung von Proteinen oder Partikeln untersucht wurde, werden zukünftige Studien die Bedeutung von LRP1 im Kontext von Autoimmunkrankheiten intensiver analysieren. Von besonderem Interesse werden Krankheitsbilder sein, die mit Defekten in der Beseitigung von apoptotischen Zellen, assoziiert sind. Verschiedene Gruppen haben bereits die Relevanz von LRP1 als Efferozytoserezeptor beschrieben und spekulieren über die mögliche Funktion in Autoimmunerkrankungen wie SLE oder RA. Darüber hinaus wurden erhöhte Mengen an sLRP1, dem Spaltprodukt der α -Kette, im Plasma von SLE und RA Patienten nachgewiesen¹⁶². Diese Studie

1 - Einleitung

zeigt, dass sLRP1 einen potenten Immunregulator darstellt und somit einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt liefert ¹⁶².

1.8 Zielsetzung

Die periphere Toleranz stellt einen essentiellen Prozess zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen dar⁵⁴. Insbesondere die Beseitigung apoptotischer Zellen durch APC trägt in diesem Zusammenhang in Form der Suppression einer pro-inflammatorischen Antwort zur Toleranzinduktion bei¹⁸. Unabhängig von der Efferozytose können Moleküle auf apoptotischen Zellen auch direkt einen anti-inflammatorischen Effekt auf die myeloide Zelle haben und periphere Toleranz induzieren. Unsere Gruppe konnte AnxA1 als eines dieser immunsupprimierenden Signale identifizieren und belegen, dass in *in vitro*-differenzierten humanen oder murinen DC die Zugabe von rekombinanten AnxA1 die TLR-induzierte Aktivierung supprimiert⁸³.

Eine essentielle und bislang ungeklärte Frage in diesem Kontext ist, an welchen Rezeptor AnxA1 bindet, um die Immunsuppression in myeloiden Zellen zu vermitteln. In Neutrophilen und Monozyten wurde zwar die FPR-Rezeptorfamilie als Rezeptor für den N-Terminus von AnxA1 beschrieben¹⁰¹, jedoch konnte durch Untersuchungen unserer Gruppe gezeigt werden, dass diese Rezeptoren für den von uns beschriebenen immunsuppressiven Effekt in DC keine Rolle spielen. Außerdem wurde in weiteren Studien deutlich, dass die Kerndomäne und nicht der N-Terminus einen suppressiven Effekt in DC induziert (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Dies lässt darauf schließen, dass in DC ein anderer AnxA1-Rezeptor als die FPRs existiert, der womöglich sogar verschiedene Annexine bindet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen AnxA1-Rezeptor auf APC zu identifizieren und zu analysieren, ob dieser für die AnxA1-vermittelte Immunsuppression verantwortlich ist. Dieser Rezeptor würde das Verständnis einer durch Efferozytose ausgelösten Immunsuppression erweitern und neue Wege für die Manipulation dieser Signalwege im Kontext von Autoimmunität oder der Tumorthherapie eröffnen.

2 Materialien

2.1 Reagenzien & Chemikalien

Reagenzien/Chemikalie	Firma
Albumin Standard (BSA)	Thermo Scientific
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Direct Tail PCR Buffer	PeqLab
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore
Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Roth
CHAPS	AppliChem
CFSE	Sigma
Benzonase Nuclease	Novagen
Kanamycinsulfat	Calbiochem
LRP1, human	BioMac
Lysozym	Roche
Mausserum	PAA
Para-Benzoylphenylalanin (pBpa)	Bachem
Para-Azidophenylalanin (pAzf)	Bachem
PeqGreen	PeqLab
o-Phenylendiaminedihydrochlorid (OPD)	Sigma
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Power SYBR Green PCR Master Mix Protease	Life Technologies
PreScission Protease	GE Healthcare
PRMT6, human	SinoBio
RAP-GST, human	Enzo
Triton X-100	Sigma
Triton X-114	Sigma
Tween 20	Gerbu
Vybrant DiD	Life Technologies

2.2 Kits & Zubehör

Kits/Zubehör	Firma
Glutathion Sepharose 4B Beads	GE Healthcare
IgG Sepharose Beads	GE Healthcare
IL-12 ELISA (murin)	Peprotech
IL-6 ELISA (murin)	BD Pharmigen
Limulus Amebocyten Lysat (LAL) QCL-1000	Lonza
NE-PER Nuclear & Cytoplasmatic Extraction Reagents	Thermo Fisher
Protein G Sepharose Beads	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.3 Geräte & Materialien

Geräte & Materialien	Firma
7500 Real Time PCR Systems	Applied Biosystems
ATTANA A100	ATTANA
Chemi-Smart-5100	Vilber Lourmat
Durchflusszytometer	FACS Canto II, BD
EIA/RIA half area 96 well Platten	Corning
Filter (0,22µm)	Greiner
Immobilon PVDF Membran	Millipore
MicroAmp 96 well PCR Platten	Life Technologies
Microplate Reader 680	Eppendorf
NanoDrop ND-1000 Photospectrometer	Peqlab
PCR-Tube Streifen 0,2ml	Starlab
PCT-200 DNA-Engine Thermal Cycler	BioRad
UV-Stratalinker (265 nm & 365 nm)	Stratagene
ZelluTrans Dialyseschläuche (MWCO 8–10 kDa)	Roth

2.4 Puffer & Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Mengenangabe
ACK-Puffer	Ammoniumchlorid	155 mM
	Kaliumbicarbonat	10 mM
	EDTA	0,1 mM
Annexin Bindungspuffer (ABP)	HEPES	10 mM
	NaCl	140 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
Blocklösung (ELISA)	PBS	
	FCS	10% (v/v)
Blocklösung (Western Blot)	Milch oder BSA	5% (w/v)
	TBS-T	
Citratpuffer pH 5,0	Zitronensäure	3 mM
	Natriumcitrat	7 mM
Coatingpuffer I (ELISA Peprotech)	PBS	
	FCS	10% (w/v)
Coatingpuffer II (ELISA BD)	Natriumcarbonat	100 mM
Coomassie-Lösung	Coomassie Brilliant Blue	0,26% (w/v)
	Methanol	40 % (w/v)
	Eisessig	10% (w/v)
Coomassie-Entfärber	Ethanol	30% (w/v)
	Eisessig	10% (w/v)
Lämmli-Puffer, 4x	Tris, pH 7,4	250 mM
	SDS	8% (w/v)
	DTT	200 mM
	Glycerol	20% (w/v)
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Laufpuffer (SDS-Page)	Tris, pH 7,4	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
Liganden-Bindungs-Puffer (LBP)	TBS	
	Tween20	0,05% (w/v)
	CaCl ₂	5 mM
Lysepuffer, bakteriell nativ	Tris pH 7,4	
	NaCl	300 mM
	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	Lysozym	0,5 mg/ml
	CHAPS	1% (w/v)
NH ₄ Ac pH 3,4	Ammoniumacetat	5 mM
OPD Lösung	o-Phenylendiamin	0,5 mg/ml
	H ₂ O ₂	0,1% (w/v)
	NaCl	137 mM
	NH ₂ PO ₄	8,1 mM

2 - Materialien

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Mengenangabe
PBS	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
RIPA-Lysepuffer	Tris pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1% (w/v)
	Na-Deoxycholat	1% (w/v)
	SDS	0,1% (w/v)
Sammelgel-Puffer	Tris pH 6,8	24 mM
	Acryamid	5% (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (w/v)
Spaltungspuffer pH7,0	Tris pH 7,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
TBS	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
Transfer Puffer (Western Blot)	Tris pH 7,4	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (w/v)
Trenngel-Puffer	Tris pH 8,8	37,5 mM
	Acryamid	8-10% (w/v)
	APS	0,03% (w/v)
	Temed	0,1 % (w/v)
Triton-Lysepuffer	Tris pH 7,4	30 mM
	NaCl	120 mM
	Glycerol	10% (w/v)
	Triton -X 100	1% (w/v)
	CaCl ₂	2 mM
TST	Tris pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05% (v/v)
Verdünnungspuffer (ELISA & FACS)	PBS	
	FCS	10% (v/v)
Waschpuffer (ELISA)	PBS	
	FCS	10% (v/v)

2.5 Medien

2.5.1 Medium für Bakterien

Bakterienmedium		
LB Agarplatten	LB Medium Agar	20 g/l
LB Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl	10 g/l 5 g/l 10 g/l

2.5.2 Medien für eukaryotische Zellen

Zellkulturmedium & Zusätze	
Medium für Dendritische Zellen (primäre, murine)	RPMI + 10% FCS + msGM-CSF (20ng/ml)
Medium für JE 6.1	RPMI + 10% FCS
Medium für L929	DMEM + 10%FCS
Medium für Makrophagen (primäre, murine)	DMEM + 10% FCS + 30% L929 SN
Medium für Raw264.7	DMEM + 10% FCS
Medium zum Einfrieren	DMEM/RPMI + 20% FCS + 10% DMSO
mGM-CSF	Immunotools
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Polymyxin B	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	
BL21 (DE3) pLysS	Novagen
DH10B	Life Technologies
Rosetta Gami (DE3) pLysS	Novagen
KRX	Promega

2.6.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinien		
L929	(ATCC CCL-1)	Fibroblasten (murin)
Raw264.7	(TIB-71)	Makrophagen (murin)
MEF-1	(ATCC CRL-2214) LRP1 WT	Embryonale Mausfibroblasten
MEF-2	(ATCC CRL-2216) LRP1 KO	Embryonale Mausfibroblasten
MEF-2 K4	(hmLRP1 rekonstituiert)	Prof. P. May, Universität Düsseldorf
JE6.1	(ATCC TIB-152)	T-Zellen (human)

2.6.3 Mausstämme

Mausstamm	Transgen/Deletion	Bezugsquelle
B6.129P2-Lyzs ^{tm1(cre)lfo} /J	Cre Rekombinase unter Lysozym M Promotor	Prof. Ingrid Förstner, Universität Düsseldorf
B6.Cg-Tg (Itgax-cre)1-1Reiz/J	Cre Rekombinase unter CD11c Promotor	Jackson Lab
B6;129S7-Lrp1 ^{tm2Her} /J	LRP1 in Exon 2 mit LoxP Seiten	Jackson Lab
B6.B10ScN-Tlr4 ^{lps-del} /JthJ	Tlr4 defizient	S. Akira, Department of Host Defense, Osaka University, Osaka, Japan

2.7 Materialien für die Molekularbiologie

2.7.1 PCR-Reagenzien

Name	Anwendung	Firma
SYBR Green	qRT-PCR	Applied Biosystems
RedTaq Ready Mix	Genotypisierung	Sigma
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	cDNA Synthese	Applied Biosystems
KOD Hot Start DNA Polymerase	PCR, Klonierung	Promega

2.7.2 PCR-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Sigma synthetisiert und der Primerstock mit Wasser auf 100 μ M eingestellt.

Genotypisierung

Zielgen	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
CD11cCre	ACTTGGCAGCTGTCTCCAAG	GCGAACATCTTCAGGTTCTG
LysM Wildtyp	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC
LysMCre	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC	CCCAGAAATGCCAGATTACG
LRP1lox	CATACCCTCTTCAAACCCCTTCCTG	GCAAGCTCTCCTGCTCAGACCTGGA

Quantitative Real-time PCR

Zielgen	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
IL-12b	CCCAGAAATGCCAGATTACG	GAGGAACGCACCTTTCTGGT
GAPDH	AGTGCCAGCCTCGTCCCGTA	GCCACTGCAAATGGCAGCCC
LRP1	TGCTCGGATGGACAAGATCG	GCGTGAGTTCTGTCACTCCA

Primer für pBpa-Anx1 Klonierung

Name	AS	Primer	Sequenz (5'→3')
E50	N43Amb	fwd	GCCCCTACCCTTCCTTCTAGGTATCCTCGGATGTTGC
		rev	GCAACATCCGAGGATACCTAGAAGGAAGGGTAGGGGC
E51	K53Amb	fwd	GGATGTTGCTGCCTTGCACTAGGCTATCATGGTTAAAGG
		rev	CCTTTAACCATGATAGCCTAGTGCAAGGCAGCAACATCC
E52	E147Amb	fwd	GACAACAAGATCTAACTAGCAAATCAGAGAGATTAATAG
		rev	CTATTAATCTCTCTGATTTGCTAGTTAGATCTTGTTGTC
E53	E158 Amb	fwd	GATTAATAGAGTCTACAGATAGGAGCTGAAAAGAGATCTGG
		rev	CCAGATCTCTTTTCAGCTCCT ATCTGTAGACTCTATAATC
E54	E159 Amb	fwd	GATTAATAGAGTCTACAGAGAATAGCTGAAAAGAGATCTGGCC
		rev	GGCCAGATCTCTTTTCAGCTATTCTCTGTAGACTCTATTAATC
E55	L192Amb	fwd	GGTGACCGTTGTGCAAGACTAGAGTGTGAATCAAGATTTGGC
		rev	GCCAAATCTTGATTCACACTCTAGTCCTGACAACGGTCACC

2 - Materialien

Name	AS	Primer	Sequenz (5'→3')
E56	Y207Amb	fwd rev	CAGATGCCAGGGCTTTGTAGGAAGCTGGAGAAAGGAG CTCCTTTCTCCAGCTTCCTACAAAGCCCTGGCATCTG
E57	K242Amb	fwd rev	GTGTTTCAGAATTACGGATAGTACAGTCAACATGAC GTCATGTTGACTGTACTATCCGTAATTCTGAAACAC
E58	Y243Amb	fwd rev	CAGAATTACGGAAAGTAGAGTCAACATGACATGAAC GTTTCATGTCATGTTGACTCTACTTTCCGTAATTCTG
E59	N249Amb	fwd rev	GTACAGTCAACATGACATGTAGAAAGCTCTGGATCTGG CCAGATCCAGAGCTTTCTACATGTCATGTTGACTGTAC
E60	K287Amb	fwd rev	GAGAAGCTGTACGAAGCCATGTAGGGTGCCGGAAGCTGCC GGCGAGTTCCGGCACCCCTACATGGCTTCGTACAGCTTCTC
E61	K317Amb	fwd rev	GAAATCAAAGTATTTTACCAGTAGAAGTATGGAATCTCTCTTTGCC GG AAAGAGAGATTCCATACTTCTACTGGTAAATACTTTGATTC
E62	K319Amb	fwd rev	GTATTTTACCAGAAGAAGTAGGGAATCTCTCTTTGCCAAGCC GGCTTGGCAAAGAGAGATTCCCTACTTCTTCTGGTAAATACT
E88	K178Amb	fwd rev	CATCTGGAGACTTTTCGGTAGGCCTTGCTTGCTCTTGC GCAAGAGCAAGCAAGGCCTACCGAAAGTCTCCAGATG
E89	R204Amb	fwd rev	TTTGGCTGATACAGATGCCTAGGCTTTGTATGAAGCTGGA TCCAGCTTCATACAAAGCCTAGGCATCTGTATCAGCCAAA
Y315	Y315Amb	fwd rev	CGGAAATTGACATGAATGAAATCAAAGTATTT- TAGCAGAAGAAGTATGGAATC GATTCCATACTTCTTCTGCTAAAATACTTTGATTTCAATTCATGTCA- ATTTCCG
mAnxA1 (Ndel)		fwd	GGGAATTCCATATGGCAATGGTATCAGAATTCC
mAnxA1 (BamHIII)		rev	CCTGGGATCCCCGATGGTTTCCACCACACAGAGC(C)

Vektoren

Name	Codiert für	Bezugsquelle
pET41a-FPPmAnxA1	msAnxA1 mit C-terminalen, FLAG Tag, PreScission Protease Schnittstelle, ProteinA Tag	B. Linke, DKFZ Heidelberg
pEVOL-pBpF	<i>M.j.</i> para-Benzoylphenylalanin RS (2 Kopien +tRNA)	Prof. Peter G. Schultz, Scribbs Research Institute, San Diego
pEVOL-pAzF	<i>M.j.</i> para-Azidophenylalanin RS (2 Kopien +tRNA)	Prof. Peter G. Schultz, Scribbs Research Institute, San Diego

2.8 Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung	Firma
α FLAG	M2	Maus IgG1	1:1000	Sigma
α LRP1 (α -Kette)	8G1	Maus IgG1	1:1000	Progen
α LRP1 (α -Kette)	alpha2MRalpha2	Maus IgG1	1:1000	Acris
α LRP1 (β -Kette)	EPR3724	Kaninchen	1:20000	Epitomics (Abcam)
α -Tubulin	B-1-5-2	Maus IgG1	1:8000	Sigma
α LRP1-FITC (α -Kette)	I4C2	Maus IgG1	1:100	BioMac
α CD11c	N418	Hamster IgG	1:200	Biolegend
α F4/80	BM8	Ratte IgG2b	1:200	Life Technologies
α ms AnxA1	MAx 550	Maus IgG2b	1:50	Dr. Heiko Weyd, DKFZ

2.9 Software

Software	Firma
7500 Software v2.0.1 oder höher	Applied Biosystems
Chemi-Capt 5000 v15.02	Vilber Lourmat
FACSDIVA v6.1.2	BD Bioscience
FlowJo v7.2.4	TreeStar
Light cycler 480 software	Roche
Microplate Manager v5.2.1	Bio Rad
Microsoft Office 2010 & 2013	Microsoft
NanoDrop 1000 v3.7.1	Peqlab
TraceDrawer	ATTANA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische und immunologische Methoden

3.1.1 Aufreinigung von rekombinanten murinen AnxA1

Rekombinantes murines Annexin A1 wurde gemäß der Promotionsarbeit von B. Linke, 2010, DKFZ Heidelberg, hergestellt, die die genauen Angaben beinhaltet. Im Folgenden wird lediglich der generelle Ablauf beschrieben. Kompetente Bakterien wurden mit dem prokaryotischen Expressionsvektor pET-41aFPP transformiert, in den zuvor murines AnxA1 kloniert wurde. Nach Ausstrich der transformierten Bakterien auf Agarplatten wurden einzelne Kolonien gepickt und Vorkulturen in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft. Aus diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag 3 L Bakterienkultur hergestellt und bis zu einer OD von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Durch IPTG-Zugabe wurde anschließend die AnxA1-Expression induziert und die Kultur für weitere 3-4 Stunden inkubiert, in der die Bakterien das AnxA1 exprimieren. Nach Zentrifugation der Bakterienkulturen und Lyse des Bakterienpellets erfolgte die Aufreinigung über IgG Sepharose-Säulen, an die der Protein A Tag des AnxA1-Fusionsprotein bindet. Anschließend wurde intensiv mit TBS-Tx-114 gewaschen, um LPS Kontaminationen in der Präparation zu entfernen. Ein weiterer Waschschrift mit TBS Tx-110 entfernt das Tx114, welches in späteren Anwendungen stören würde. Nach Beendigung des Waschens wurde mittels PreScission Protease das AnxA1 von der IgG-Säule gelöst und die PreScission danach durch Inkubation mit GSH-Beads entfernt. Im Anschluss wurde gegen PBS dialysiert und das AnxA1 steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Zusätzlich wurde für jede Präparation der LPS-Gehalt mittels LAL-Assay gemäß Herstellerprotokoll überprüft.

3.1.2 Herstellung pBpa-modifizierter AnxA1-Varianten

Für UV-induzierte Kreuzvernetzungsstudien wurde modifiziertes AnxA1 hergestellt, in dem eine definierte Aminosäure durch die photoreaktive Aminosäure para-Benzoylphenylalanin (pBpa) ausgetauscht wurde. Hierfür wurde in 3 Teilschritten an gezielt ausgewählten Stellen in die murine AnxA1 Sequenz im eukaryotischen Expressionvektor pET-41a(+) ein Amber Stopp-Codon (UAG) eingebaut. Der erste Schritt besteht aus zwei parallelen PCRs. Dabei wurden die fwd und rev Primer so gestaltet, dass sie an der ausgewählten Aminosäuresequenz ein „TAG“

enthalten und am 5' Ende eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Eine PCR besteht aus dem *forward* (fw)Primer mit dem TAG und dem *reverse* (rev) Primer mit Restriktionsschnittstelle. Für die andere PCR wird der rev Primer mit TAG und der fwd Primer mit Restriktionsschnittstelle verwendet. In der zweiten PCR werden die zwei entstandenen PCR Produkte nochmals mittels der fwd und rev Primer für die Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Sowohl dieses PCR-Produkt als auch der AnxA1-Expressionsvektor wurden anschließend genau mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und das PCR Produkt aus der zweiten PCR in den Vektor ligiert. Die Transformation der kompetenten Bakterien erfolgte sowohl mit diesem modifiziertem AnxA1-Vektor, als auch mit dem pEVOL-Vektor, der für eine orthogonales tRNA⁷tRNA Synthetase Paar codiert, wodurch das pBpa an dem zu einem Amber Stopp-Codon mutiertem Triplet eingebaut werden kann. Die Bakterienkultur wurde gemäß der regulären AnxA1 Expression angeimpft und ab einer OD von ~ 0,5 mit 1 mM pBpa versetzt. Nach 2-3 Stunden wurde die Expression des AnxA1 mittels IPTG induziert und die weitere Aufreinigung erfolgte analog zur regulären AnxA1 Aufreinigung.

3.1.3 Zellyse und Proteinbestimmung

Für die Herstellung von Zellysaten wurde entweder RIPA-Puffer oder Triton-X100 Puffer verwendet. Bei der Lyse mit RIPA Puffer wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer inkl. Proteasen- und Phosphataseninhibitoren 10 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Lysate für ca. 10 Sekunden sonifiziert und 15 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Lysat-enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung von Triton-X100 Lysaten wurden die Zellen analog zu RIPA-Lysaten in kaltem PBS gewaschen und in Triton X-100 Puffer für 20 Minuten auf Eis lysiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration von Zellysaten wurde mittels BCA-Kit gemäß Herstellerprotokoll bestimmt. Die Lysate wurden hierfür in der Regel 1:4 verdünnt, um eine Konzentration innerhalb der BSA-Standardkurve von 0,125 – 2 mg/ml zu erhalten. Nach Zugabe des BCA-Reagenz und 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 560 nm gemessen und die finale Proteinkonzentration anhand der Standardkurve errechnet.

3.1.4 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen (IP) wurden Protein G- Sepharose Beads, Triton X-100 Zelllysate und der anti-FLAG Antikörper M2 (Sigma) verwendet. Pro IP wurden 40 µl Protein G Beads in ein Reaktionsgefäß überführt und 3-mal mit 1 ml Triton X-100 Puffer gewaschen und trocken gesaugt. Anschließend wurden pro IP 5 µg M2 Antikörper in 100 µl Triton X-100 Puffer zu den Beads pipettiert und für 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Die Triton-X-100-Lysate wurden über Nacht mit den M2-gekoppelten Beads inkubiert und die IP am nächsten Tag fünfmal mit Triton X-100 Puffer gewaschen. Für jeden Waschschrift wurden die Beads mit 1ml Triton X-100 Puffer versetzt und bei 3500 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads vollständig trocken gesaugt und in 100 µl reduzierendem Probenpuffer für 10 Minuten bei 80°C gekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20° eingefroren oder direkt mittels SDS-Page und Western Blot analysiert.

3.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Größe. Das Gel besteht aus einem polymerisierten Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Abhängig vom Verhältnis der beiden Chemikalien zueinander kann die Porengröße des Gels variiert werden und dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine angepasst werden. Die denaturierten Proteine werden mit SDS beladen, welches sich an den hydrophoben Rest der Aminosäurekette anlagert. Bedingt durch die negative Ladung des SDS wandern die Proteine im Gel Richtung Anode, wobei die Laufweite sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Proteinmasse verhält. Die Auftrennung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in 8-10%-igen Trenngelen bei 135 V für ca. 1,5 – 2 h. Im Anschluss wurden die Gele mit Coomassielösung gefärbt oder für die Western Blot Analyse verwendet.

3.1.6 Western Blot & Immundetektion

Beim Western Blot werden die zuvor mittels eines SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf einen PVDF-Membran transferiert und durch Immundetektion analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich das Wet-Blot Verfahren angewendet. Dafür wurde in eine

Blotkassette zunächst ein Schwämmchen und darauf zwei Whatmanpapiere in der Größe des SDS-Gels gelegt. Auf das Whatmanpapier wurde zuerst das Gel, dann die Membran, dann wieder zwei Whatmanpapier und ein Schwämmchen gelegt und die Blotkassette geschlossen. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 10 Sekunden in Methanol aktiviert und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Die fertige Blotkassette wurde in eine Blotkammer eingesetzt und komplett mit Blotpuffer bedeckt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte 1,5 h lang bei 400mA und variabler Spannung. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milch in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte wahlweise über Nacht bei 4° oder für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Roller in einem 50 ml Röhrchen mit 3,5 ml Antikörperlösung. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen 3-mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und daraufhin mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen wurden die Membranen mit Hilfe des ECL Detektionsreagenz inkubiert und die spezifischen Banden in einer Entwicklermaschine dokumentiert.

3.1.7 Zytokin-ELISA

Im Zellüberstand enthaltene Zytokine wurden mittels ELISA gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kit von Peprotech verwendet, um in Makrophagen- oder DC-Zellkulturüberständen IL-12-Konzentrationen zu bestimmen. Alle im Herstellerprotokoll angegebenen Volumina wurden halbiert, da 96-well-Platten mit halber Fläche verwendet wurden. Die Beschichtung der Platten erfolgt mit Capture Antikörper in PBS (1:400) über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Die restliche Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Die Entwicklung erfolgte mit OPD-Substratlösung und wurde nach 5-10 Minuten mit 3 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption der Proben wurde in einem Multiplate Reader bei 490 nm gemessen und die finalen Zytokinkonzentrationen mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.

3.1.8 LRP1-Bindungsstudien

Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen im möglichst nativen Zustand können ELISA-ähnliche Bindungsstudien durchgeführt werden. Dazu wurde entweder humanes LRP1 (2 µg/ml) oder humanes AnxA1 (5 µg/ml) in 0,5M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,6) in die Löcher einer 96 Loch Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte

3 - Methoden

5-mal mit Ligandenbindungspuffer (LBP) gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 3% Milch in LBP blockiert. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem Interaktionspartner in verschiedenen Konzentrationen für 1 h bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit LBP wurden Antikörper gegen den gebundenen Interaktionspartner hinzu pipettiert und die Platte wieder für 1 h bei 37°C inkubiert und erneut dreimal mit LBP gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:2000) für eine weitere Stunde bei 37°C. Die Interaktion wurde im Anschluss mit Hilfe von OPD-Substratlösung sichtbar gemacht und die Absorption nach dem Abstoppen mit 3 M Schwefelsäure im ELISA-Reader bei 490 nm gemessen.

3.1.9 Liganden / Rezeptor Blot

Der Liganden bzw. Rezeptor Blot ist eine Western Blot-basierte Variante zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen und wurde insbesondere für Interaktionen von sehr großen Rezeptoren und kleineren Liganden entwickelt. LRP1 oder AnxA1 (2-5 µg/ Spur) wurden hierfür mittels eines Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine PVDF-Membran transferiert. Im Unterschied zum klassischen Western Blot enthält der Puffer für den Ligand Blot 2 mM CaCl₂ und 0,1% SDS zur besseren Übertragung von sehr großen Proteinen wie LRP1. Der Transfer erfolgte für 4 h bei 45 V auf Eis und die Membran wurde anschließend in 3% Milch in LBP blockiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit dem jeweiligen Interaktionspartner LRP1 (0,5 µg/ml) oder Anx A1 (2 µg/ml) in LBP über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Röhrchen auf einem Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit LBP wurde die Membran analog zur den ELISA-basierten Bindungsstudien zunächst 1 h bei RT mit einem Primärantikörper gegen den Interaktionspartner inkubiert und nach erneutem Waschen der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h bei RT hinzugegeben. Die Interaktion wurde mittels ECL-Reagenz visualisiert und in einer Entwicklermaschine detektiert.

3.1.10 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus humanen oder murinen Zellen erfolgte mittels RNeasy Kit (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend bei 260 nm gemessen.

3.1.11 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die zuvor isolierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) gemäß Herstellerprotokolls in cDNA umgeschrieben. Für jede PCR wurden 6,8 µl Master Mix zu 0,5 bis 1 µg RNA in 13,2 µl Nuklease-freiem Wasser pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde im PTC-200 DNA Engine Thermal Cycler (Bio Rad) durchgeführt. Master Mix-Zusammensetzung und PCR-Programm sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.1.12 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-time PCR basiert, ebenso wie die konventionelle PCR, auf der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Kurze spezifische Oligonukleotide (Primer) lagern sich hierbei an einen durch das Design der Primer genau definierten DNA-Abschnitt an und ermöglichen in der Anwesenheit von dNTPs und der thermostabilen DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA Stranges. Nach jedem Reaktionszyklus verdoppelt sich hierbei die Menge der doppelsträngigen DNA (dsDNA), was durch den dsDNA-interkalierenden Reporterfarbstoff SYBR Green detektiert werden kann. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen und verhält sich proportional zur Menge der synthetisierten dsDNA wodurch die relative und absolute Quantifizierung von Transkripten ermöglicht wird. Die Amplifikation erfolgte im 7500 Real-Time PCR System und die Detektion mittels 7500 Software v2.0.1. Die Überprüfung der Schmelzkurven diente der semi-quantitativen Analyse. Der Master Mix und das PCR-Programm ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen. Die relative Genexpression wurde mittels der auf das Referenzgen GAPDH normalisierten Ct-Werte ermittelt.

3.1.13 Herstellung von AnxA1- oder PRMT6-gekoppelten fluoreszierenden Beads

Für Phagozytoseexperimente wurde an fluoreszierende Beads entweder murines Anx A1 oder das FLAG-getaggte Kontrollprotein PRMT6 gekoppelt. Einen Tag vor dem Phagozytoseexperiment wurden 25 ng Protein pro Million Beads zugesetzt und in 500 µl sterilem PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Direkt vor dem Phagozytose-Experiment wurden die Beads für 10 Minuten bei 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und noch einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend werden die Beads in PBS resuspendiert und direkt vor Zugabe zu den Zellen gevortext

3.2 Zellbiologische Experimente

3.2.1 Isolation muriner Knochenmarkszellen

Zur Generierung muriner dendritischer Zellen oder muriner Makrophagen werden hämatopoetische Vorläuferzellen benötigt, die aus dem Knochenmark der Beinknochen gewonnen werden können.

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und mit den Extremitäten auf einer Unterlage fixiert. Als nächstes wurden die Hinterbeine entnommen und von Fell- und Geweberesten befreit und der Oberschenkel- vom Unterschenkelknochen getrennt. Die Knochen wurden an beiden Enden vorsichtig geöffnet und das Knochenmark mittels einer 23G-Kanüle und Medium in eine mit Medium gefüllte Petrischale gespült. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Röhrchen überführt und einmal mit Medium gewaschen (10 Minuten, 460 x g, 4°C). Zur Entfernung von Erythrozyten wurden diese mit 3 ml ACK-Puffer für 30 s lysiert, abzentrifugiert und die verbleibenden Vorläuferzellen erneut mit Medium gewaschen. Anschließend erfolgte die Differenzierung zu dendritischen Zellen oder Makrophagen.

3.2.2 Differenzierung muriner dendritischer Zellen (BMDC)

Hämatopoetische Vorläuferzellen wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml/Loch in eine 24 well-Platte ausgesät. Dem Differenzierungsmedium wird dabei murines rekombinantes GM-CSF (20ng/ml) zugesetzt welches die Vorläuferzellen zu unreifen BMDC differenziert. An Tag 2 und 4 nach der Isolation werden jeweils 800 µl Medium abgenommen und neues GM-CSF-haltiges Medium hinzugegeben. An Tag 6 oder 7 nach Isolation der Vorläuferzellen wurden die nicht-adhärenenten Zellen vorsichtig von der Platte abgespült und für die jeweiligen Experimente ausplattiert.

3.2.3 Differenzierung muriner Makrophagen

Die aus dem Knochenmark isolierten Vorläuferzellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in Makrophagenmedium, welches den M-CSF haltigen L929- Zellüberstand enthält, in 10 cm Petrischalen in einem Volumen von 10 ml ausgesät. Nach 7 Tagen wur-

de das Medium vollständig entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mittels Trypsinierung und Abschabens von den Zellkulturplatten gelöst und in ein Röhrchen mit FCS-haltigem Medium überführt und abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Danach wurden die Zellen in frischem Makrophagenmedium aufgenommen, gezählt und für die jeweiligen Experimente ausplattiert.

3.2.4 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Die Medienzusammensetzung für die jeweiligen Zellen ist auf Seite x zu finden. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in 1 ml Einfriermedium in einem Spezial-Einfrierbehältnis“, welches bei direkter -80°C Lagerung einen linearen Temperaturabfall von 1°C/min gewährleistet. Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig in einem 37°C Wasserbad und anschließenden zweimaligen Waschen und abzentrifugieren (10 ml Medium, 200 x g, 10 min) der Zellen.

Raw264.7 und L929 Zellen sind adhärente Zellen und wurden stets so kultiviert, dass sie eine Konfluenz von ca. 90% besaßen. Für das Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA verwendet.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden ein Aliquot der zu zählenden Zellen mit Trypan Blau versetzt, was ausschließlich tote Zellen anfärbt. Die lebenden, nicht angefärbten Zellen wurden gezählt und die Zellzahl entsprechend der eingesetzten Verdünnung berechnet.

3.2.5 Apoptose-Induktion

Zur Generierung früh-apoptotischer Zellen wurden Jurkat T-Zellen mit UV-C (265 nm), 50 mJ/cm² bestrahlt (6 well-Platten, 2 ml Zellsuspension pro Loch, 1 x 10⁶ Zellen/ml) und für 2,5-3 h bei 37°C inkubiert.

3.2.6 Phagozytose-Experimente

Um den AnxA1-Effekt auf die Phagozytose zu analysieren, wurden Experimente mit primären murinen Makrophagen, DC oder MEFs durchgeführt. Die Makrophagen oder MEFs wurden einen Tag vorher in 12- oder 24-Loch-Platten ausgesät und direkt vor Beginn des Experiments mit serumfreiem Medium gewaschen. Das Experiment selbst wurde ebenfalls in serumfreiem Medium durchgeführt, um Nebeneffekte durch im Serum vorhandene Proteine zu vermeiden. Bei murinen DC war der Serumentzug nicht möglich, da die Zellviabilität sich ohne Serum deutlich reduzierte. Im Rahmen einer 4 bis 8-stündigen Kinetik wurden anschließend die zuvor hergestellten FITC-gekoppelten Beads in einem Volumen 50 μ l zu den Zellen gegeben. Nach Beendigung der Kinetik wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 10% FCS/PBS um alle nicht phagozytierten Beads zu entfernen. Die Phagozytose wurde anschließend mittels FACS analysiert, in dem alle lebenden, FITC-positiven Zellen gemessen wurden. Je nach untersuchtem Zelltyp wurden die Zellen zusätzlich für einen Zelltypspezifischen Marker gefärbt und nur die für diesen Marker positiven Zellen in die Messung mit einbezogen. Für DC Messungen wurden CD11c⁺ und für Makrophagen F4/80⁺ Zellen analysiert und deren Menge der FITC-positiven Zellen dargestellt.

3.2.7 Suppressions-Experimente

Um zu untersuchen, ob AnxA1 oder früh-apoptotische Jurkat T-Zellen (aJ) einen Einfluss auf die TLR-induzierte Zytokinsekretion von primären murinen Makrophagen oder DC ausübt, wurden sogenannte Suppressions-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 48-Loch Platten ausgesät (1×10^5 /400 μ l) und ca. 4 h ruhen gelassen. Anschließend wurden entweder aJ zu APC im Verhältnis 5:1 oder murines rekombinantes AnxA1 (250 oder 500 nM) in 100 μ l hinzugegeben und über Nacht (14-16 h) im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mittels TLR9 Agonist CpG (10-30 nM) für 24 h, um im Anschluss die IL-12-Konzentration im Überstand mittels ELISA zu bestimmen. Für die Analyse auf mRNA-Level wurden die Zellen in 24 Loch Platten ausgesät (2×10^5 / 900 ml), über Nacht mit rekombinatem AnxA1 inkubiert und am nächsten Tag eine CpG-Kinetik zwischen 0 und 10h durchgeführt. Das gesamte Experiment wurde in Gegenwart von Polymyxin B durchgeführt um selbst geringste Kontaminationen LPS im rekombinanten AnxA1 zu neutralisieren und somit die Endotoxintoleranz zu verhindern.

3.2.8 Färbung von T-Zellen mit Vybrant DiD

Für Phagozytosestudien wurden Jurkat T-Zellen vor dem Experiment mit Vybrant DiD gefärbt. Dieser Farbstoff ist lipophil und lagert sich unspezifisch in die Lipide der Zellmembran an. Die benötigte Anzahl an T-Zellen wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Für die DiD Färbung wurde anschließend pro 10^6 Zellen 5 μ l DiD hinzupipettiert und das Röhrchen für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit serumhaltigen Medium abgestoppt und die Zellen noch einmal mit komplettem Medium gewaschen.

3.2.9 UV-Kreuzvernetzung von pBpa-modifiziertem AnxA1

Mit pBpa modifiziertes AnxA1 kann durch UV-Bestrahlung eine kovalente Bindung mit dem putativen Rezeptor ausbilden, was die Interaktion für den weiteren Aufreinigungsprozess verstärkt. Die Kreuzvernetzungstudien wurden mit der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie Raw264.7 durchgeführt. Die Zellen wurden am Tag vor dem Experiment in 15 cm Petrischalen ausgesät (1×10^7), so dass sie nach 24 h ca. eine 90%ige Konfluenz besaßen. Als nächstes wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit serumfreien Medium gewaschen um anschließend 100 μ g pBpa-modifiziertes AnxA1 in 10 ml Medium dazuzugeben. Dies entspricht der geringsten suppressiven Konzentration (250 nM), die für Zytokinmessungen eingesetzt wurde. Damit AnxA1 den Rezeptor bindet ohne internalisiert zu werden, wurden die Zellen 30 min auf Eis mit dem pBpa-AnxA1 inkubiert und anschließend 20 Minuten auf Eis mit bestrahlt UV-A (365 nm) bestrahlt. Im Anschluss wurde das Medium komplett entfernt und die Zellen zweimal mit TBS + 2 mM CaCl_2 gewaschen, um nicht gebundenes AnxA1 zu entfernen. Danach wurden die Zellen in Triton X-100 Puffer lysiert die Lysate für eine anti-FLAG IP verwendet.

3.2.10 Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Für die Messungen von Bindungsaffinitäten wurde der Gerät A100 der Firma ATTANA verwendet. Auf einem LNB Carboxylchip wurde gemäß Herstellerprotokoll LRP1 immobilisiert. Dafür wurde der Chip zunächst mit EDC/SulfoNHS gemäß Herstellerprotokoll aktiviert und anschließend aufgereinigtes LRP1 (5-15 μ g/ml) in einem Natriumacetatpuffer mit pH 4,0 auf den Chip injiziert bis eine Frequenzerhöhung von 70-100 Hz erreicht war. Anschließend wurden verblie-

3 - Methoden

bene Bindungsstellen auf dem Chip mit zwei Injektionen Ethanolamin abgesättigt und der Chip in PBS umgepuffert. Für die Inkubation mit den verschiedenen Annexinen wurden diese in 6 verschiedenen Konzentrationen in PBS angesetzt, die in Triplikaten gemessen wurden. Nach jeder Anx-Injektion wurde der Chip mit 5 mM EDTA/PBS und 3M NaCl regeneriert bevor die nächste Anx-Injektion erfolgte.

4 Ergebnisse

Verschiedene Studien beschreiben den immunsuppressiven Effekt von AnxA1 und basieren in der Regel auf der Bindung des N-terminalen Peptids an Mitglieder der FPR-Familie^{85,100,101,104,106,163}. In unserer Gruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass die Blockade dieser Rezeptoren nicht zur Aufhebung der Immunsuppression in DC führt. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass mehrere Annexine (AnxA1, AnxA5, AnxA13) in der Lage sind die TLR-induzierte Aktivierung von DC zu unterdrücken nicht der N-Terminus sondern die Kerndomäne für diese suppressive Funktion verantwortlich ist (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Die Schlussfolgerung aus diesen Daten war, dass ein bislang unbekannter, weiterer Rezeptor für AnxA1 bzw. verschiedene Annexine auf DC existieren muss.

4.1 Strategien zur Identifikation des AnxA1-Rezeptors

4.1.1 Immunpräzipitationen (IP) mit WT AnxA1

Zur Identifikation des putativen AnxA1-Rezeptors auf DC, wurden bereits viele verschiedene Methoden angewandt. Dafür wurde WT AnxA1 und u.a. die Makrophagen-ähnliche Zelllinie Raw264.7 verwendet, von der aus früheren Studien (Promotionsarbeit A. Mahr, 2010) bekannt ist, dass sich die TLR-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen mittels AnxA1 supprimieren lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Co-IPs mit WT-AnxA1-vor-inkubierten Raw264.7 durchgeführt, die anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden. Aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten resultierte dabei eine Liste interagierender Proteine, die spezifisch für die AnxA1 enthaltene IP waren (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle dienten in diesen Experimenten IPs, bei denen Raw264.7 nicht mit AnxA1, deren Lysate aber mit dem anti-FLAG Antikörper und Protein G Beads inkubiert wurden.

In der resultierenden Liste wurde nach membranständigen Proteinen gesucht und alle DNA- oder RNA-, sowie Zytoskelett-bindende und intrazelluläre Proteine nicht beachtet. Nach der Selektion blieben letztendlich nur die Proteine Stomatin und Nucleolin übrig, die spezifisch oder stark angereichert in der AnxA1 Probe zu finden waren.

Stomatin wurde ursprünglich auf Erythrozyten identifiziert und ist ein transmembranes Protein, das nach dem Krankheitsbild der vererbaren hämolytischen Anämie Stomazytose benannt

4 - Ergebnisse

wurde ^{173,174}. Im Zusammenhang mit immunologischen Prozessen sind bislang jedoch keine Funktionen bekannt, und in der Literatur wird es primär als Struktur-gebender Faktor in der Zellmembran beschrieben ^{175,176}.

Nucleolin ist ein vorwiegend nukleäres Protein und an der Synthese und Reifung von Ribosomen beteiligt ^{177,178}. In den letzten Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass Nucleolin auch in einer membranständigen Form existiert und dort möglicherweise für die Aufnahme von apoptotischen Zellen eine Rolle spielt ¹⁷⁹. Folglich kommt Nucleolin als AnxA1-Rezeptorkandidat in Betracht.

Sowohl für Nucleolin als auch für Stomatin konnte mittels Western Blot Analyse bestätigt werden, dass sie grundsätzlich in Raw264.7 exprimiert werden, jedoch konnte keines der beiden Proteine in einer Co-IP validiert werden (Daten nicht gezeigt). Zu bedenken ist außerdem, dass Nucleolin in der MS-Analyse lediglich vermehrt und nicht exklusiv in der AnxA1-IP detektiert wurde, weshalb die Spezifität fraglich bleibt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Stomatin und Nucleolin als putative Rezeptorkandidaten nicht weiter untersucht.

Eine Übersicht der weiteren bislang angewandten methodischen Ansätze ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1 - Übersicht der angewandten Strategien zur Identifikation des AnxA1 Rezeptors

Methode	Kurzbeschreibung	Ergebnis	Problematik
1. Co-IP 2. SDS-PAGE 3. MS Analyse	Zellen einer AnxA1-reaktiven Zelllinie (U937 o. Raw264.7) wurden mit rekombinatem AnxA1-FLAG inkubiert und AnxA1-Komplexe durch Immunpräzipitation mit versch. Anti-AnxA1 Antikörpern präzipitiert	Viele cytosolische Interaktionspartner Membranproteine: Integrin β 2, Stomatin, Nucleolin	- Viele der Treffer auch in Isotypkontrolle zu finden - Validierung im Western Blot nicht erfolgreich - Hoher Hintergrund durch exogenes AnxA1 bzw. den anti-FLAG Antikörper
1. Pull Down 2. SDS-PAGE 3. MS Analyse	AnxA1-FLAG wurde an einer Säule immobilisiert, die Säule mit BMDC-Zelllysate inkubiert und gebundene Proteine mittels pH Gradient eluiert	Viele cytosolische Interaktionspartner Einziges Membranprotein: CD44	Sehr hoher Hintergrund durch co-eluiertes AnxA1 Keine Validierung für CD44 im Western Blot

Methoden	Kurzbeschreibung	Ergebnis	Problematik
1. Biotinylierung von Oberflächenproteinen 2. Streptavidin-IP 3. Western Blot	Die Oberflächenproteine einer AnxA1-reaktiven Zellen (Raw264.7 o. U937) wurden biotinyliert und anschließend mit AnxA1 inkubiert. Danach erfolgte eine Streptavidin- oder FLAG-IP und ein Immunoblot gegen FLAG oder Biotin.	Keine FLAG-spezifischen Banden in der Streptavidin-IP, bzw. keine Biotin-Nachweis in der FLAG-IP	Womöglich keine Bindung von AnxA1 an bereits biotinylierte Oberflächenproteine
Protein-Chip	Protein-Chip beschichtet mit 12.000 voll-längen Proteinen wird mit biotinyliertem AnxA1 inkubiert und die Bindung mittels Fluoreszenz gekoppeltem Streptavidin sichtbar gemacht und detektiert	Diverse cytosolische Bindungspartner oder open reading frames z.B. Cortaktin	Sehr viele Hits für <i>open reading frames</i> bzw. bislang nicht identifizierte Proteine erschweren Validierung. Keine Membranrezeptoren, Chip ggf. ungeeignet um Membranproteine in nativer Form binden zu lassen

Eine mögliche Ursache für die bislang nicht erfolgreiche Rezeptoridentifikation kann die schwache Bindung zwischen AnxA1 und seinem Rezeptor gewesen sein. Diese kann bei folgenden Waschschritten zum Zerfall des Komplexes und somit zum Verlust des Nachweises der Interaktion führen. Deswegen wurde eine Methode angewandt, um die AnxA1-Rezeptor-Bindung zu stabilisieren, indem eine kovalente Bindung zwischen Ligand und Rezeptor induziert wird.

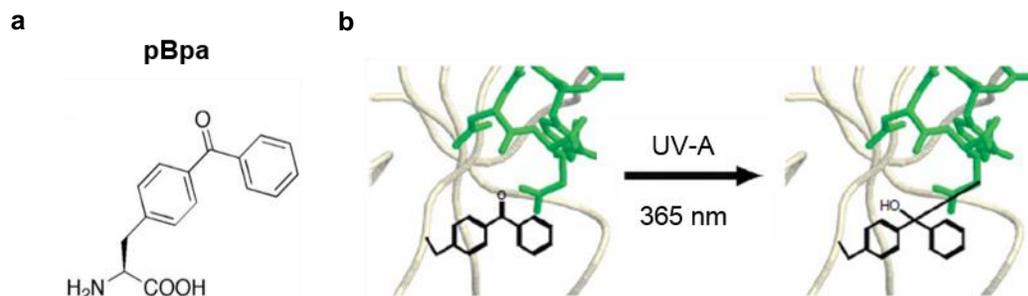


Abb. 4.1 - Schematische Darstellung der Induktion einer kovalenten Bindung mittels pBpa. a) Strukturformel des pBpa. **b)** Schema der Reaktion eines pBpa-Moleküls mit einem Interaktionspartner unter Ausbildung einer durch UV-Bestrahlung induzierten kovalenten Bindung. (modifiziert nach Hino *et al.*, 2005, Nature)

Hierfür wurde die Inkorporation einer photoreaktiven Aminosäure (AS) in das rekombinante AnxA1 gewählt. Diese bildet infolge von UV-Bestrahlung ein freies Radikal aus, das eine kova-

lente Bindung zu Interaktionspartnern in einer Entfernung von 3 Å ausbildet (Abb. 4.1a&b). Als photoreaktives Aminosäurederivat wurde p-Benzoyl-L-phenylalanin (pBpa) verwendet. Dieses System wurde in der Gruppe von P.G. Schultz etabliert und optimiert¹⁶⁴. Dieses System versprach gute Erfolgsaussichten, da es bereits mehrfach erfolgreich in Interaktionsstudien verschiedenster Art angewandt wurde¹⁶⁵⁻¹⁶⁹.

4.2 Inkorporation von p-Benzoyl-Phenylalanin in murines AnxA1

4.2.1 Auswahl der Aminosäuren für die pBpa-Inkorporation

Für die pBpa-Modifikation des AnxA1 wurden gemeinsam mit dem Strukturbiologen Dr. Clemens Wild vom BZH Heidelberg verschiedene AS innerhalb der AnxA1-Sequenz ausgewählt, die mit pBpa substituiert werden sollten. Als Grundlage für die Auswahl der AS für die Mutagenese diente die zum murinen AnxA1 Sequenz-homologe porkine AnxA1-Struktur. Die murine AnxA1-Struktur ist bislang nicht im Calcium-gebundenen Zustand beschrieben. Da jedoch insbesondere der Calcium-gebundene Zustand bei der Externalisierung auf apoptotischen Zellen eine Rolle spielt, wurde alternativ die porkine AnxA1-Struktur verwendet, die in Anwesenheit von Calcium entschlüsselt ist. Die stellenweise unterschiedlichen Positionen der jeweiligen AS in der murinen Sequenz wurden bei der Mutagenese berücksichtigt. Für die Wahl der AS wurden mehrere Kriterien unter der Berücksichtigung der derzeitigen Erkenntnisse über die strukturelle Funktion der AnxA1-Domänen festgelegt. Die erste Rationale war die Wahl von AS innerhalb der Kerndomäne. Dies beruht auf den Daten unserer Gruppe, die zeigen dass die Kerndomäne für die Immunsuppression ausreicht und der N-Terminus hierfür keine Rolle spielt (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Die zweite Rationale für die Auswahl der zu mutierenden AS war, eine dem pBpa möglichst strukturell verwandte AS zu mutieren. Die strukturelle Ähnlichkeit ist aufgrund sterischer Gründe zu bevorzugen, um zu vermeiden, dass durch den großen aromatischen Benzoylring des pBpa Faltungsprobleme im AnxA1 auftreten. Ein drittes Kriterium war, dass potentielle Bindungsstellen nicht auf derjenigen AnxA1-Seite liegen, die der Membran der apoptotischen Zelle zugewandt ist. Da jedoch keines der acht Phenylalanine im AnxA1 die oben genannten Kriterien vollständig erfüllte, wurden die nächst strukturell verwandten AS ausgewählt oder AS, die sich in der Kerndomäne und abgewandt von der apoptotischen Zellmembran befinden, sowie exponiert nach außen stehen und somit potentiell einen Rezeptor binden können. Mit Hilfe von Dr. Clemens Wild konnten außerdem anhand der 3D-Struktur des AnxA1 Areale identifiziert werden, die einer Bindungstasche gleichen. Eine Übersicht der ausgewählten Aminosäuren ist in

Tabelle 4.2 zu finden. Die ausgewählten Aminosäuren wurden durch das Amber Codon „UAG“ ersetzt, welches normalerweise ein Stopp-Codon darstellt. Damit genau an dieser Stelle das pBpa eingebaut werden konnte, musste zusätzlich zu dem modifizierten AnxA1 Expressionsvektor noch ein weiterer Vektor (pEVOL) in die Bakterien transformiert werden. Dieser codiert für ein orthogonales tRNA/tRNA-Synthetase-Paar, durch welches die pBpa-Inkorporation an der Stelle des Amber Codons erfolgt, ohne die Termination der Translation auszulösen. Die AnxA1-Variante E47 ist prinzipiell Wildtyp (WT) AnxA1, bei dem das eigentliche Stopp-Codon des WT-AnxA1 in ein anderes (UAA) umgewandelt wurde, um einen Translationsabbruch durch den pBpa-Einbau am eigentlichen Stopp-Codon des AnxA1 zu verhindern.

Tabelle 4.2 - Übersicht der pBpa-AnxA1-Varianten. Angegeben sind die mit einem Amber Codon modifizierten Aminosäuren innerhalb des murinen AnxA1, sowie die Namen der resultierenden AnxA1-Varianten.

Name	E47	E50	E51	E52	E53	E54	E55	E56	E57	E58	E59
Modifizierte AS	-	N43	K53	E147	E158	E159	L192	Y207	K242	Y243	N249
Name	E60	E61	E62	E84	E86	E87	E88	E89	E90	E91	Y315
Modifizierte AS	K287	K317	K319	D61	E104	D171	K178	R204	S273	Y283	Y315

4.2.2 Expression der pBpa-modifizierten AnxA1-Varianten

Nach erfolgreicher Klonierung der verschiedenen Mutanten in den Expressionsvektor für murines AnxA1 wurde zunächst überprüft, ob das Expressionssystem generell funktionierte und die Expression der Mutanten von der Zugabe von pBpa und der Induktion des pEVOL Vektors abhängig ist. In Abb. 4.2a wurde der Bakterienstamm KRX mit dem für WT codierenden AnxA1 Expressionsvektor sowie dem Vektor pEVOL transformiert und immer je zwei Klone analysiert. Zur frühzeitigen Überprüfung der Expression wurden drei Stunden nach der Induktion Lysate aus den Bakterien hergestellt und dahingehend untersucht, ob sich das exprimierte AnxA1 in der löslichen Fraktion oder in der unlöslichen Membranfraktion befindet. Der Großteil des exprimierten AnxA1 sollte in der löslichen Fraktion vorhanden sein. Proteine in der Membranfraktionen liegen in *inclusion bodies* vor und müssten vor Verwendung noch einmal rückgefaltet und auf Ihre Funktion getestet werden. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot und der Verwendung des AnxA1-spezifischen Antikörpers 8D10 oder mittels des anti-FLAG Antikörpers. Die zusätzliche Ponceaufärbung der Membranen diente als Ladekontrolle. Der Immunoblot zeigt, dass die Proteinexpression von WT AnxA1 (B74) allein mittels Rhamnose induziert wurde und unabhängig vom orthogonalen tRNA/tRNA-Synthetase Paar erfolgte, welches durch

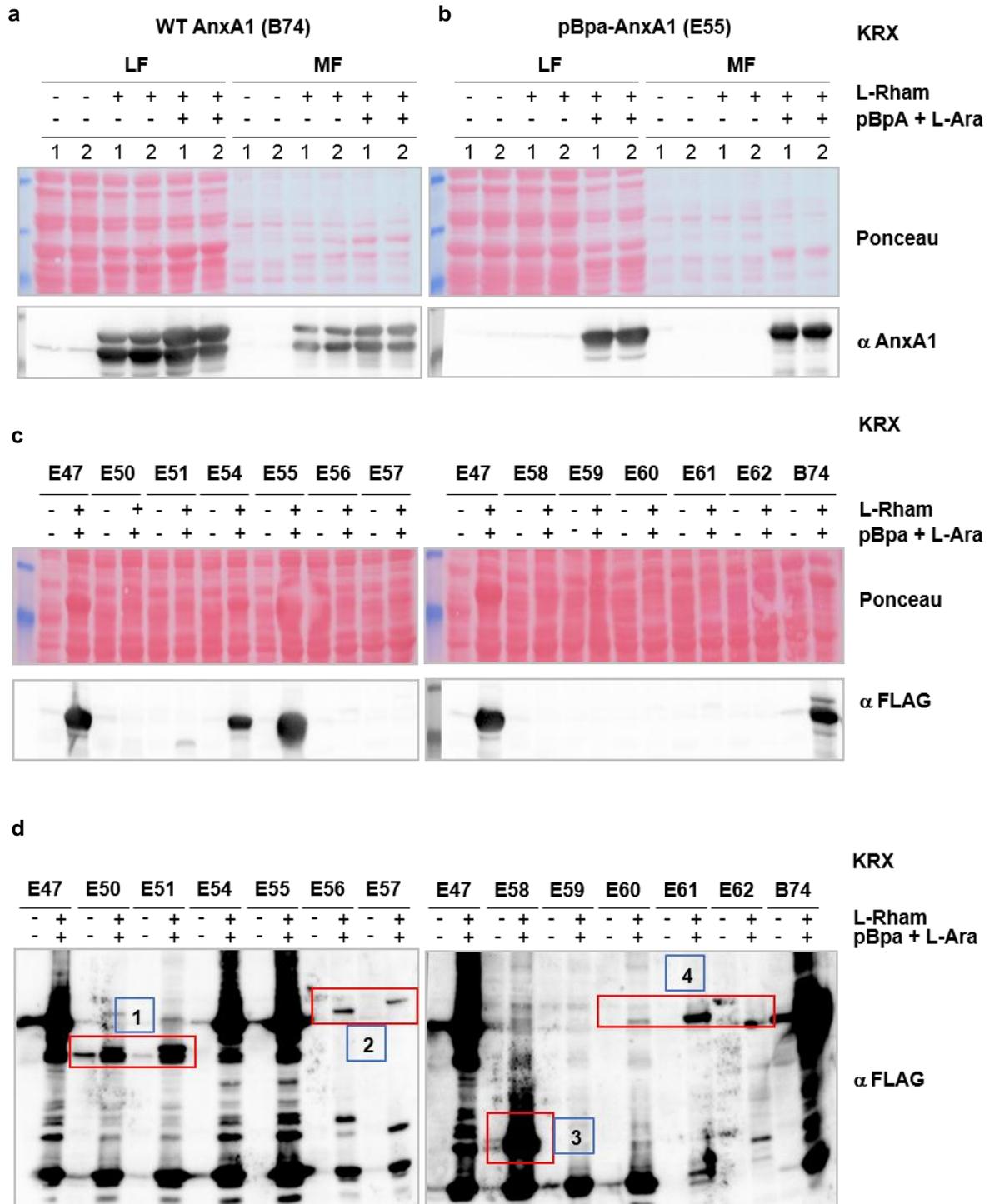
4 - Ergebnisse

Arabinose induziert wird. Auch die zusätzliche Zugabe von pBpa hatte dabei keinen Einfluss auf die AnxA1-Expression und ist somit nicht toxisch für die Bakterien selbst.

Im Anschluss wurde die Expression einer der mutierten AnxA1-Varianten (E55) analysiert (Abb. 4.2b). Die Variante E55 enthält anstatt eines Lysins an Position 192 das Amber Stopp-Codon. Auch hier wurden zwei Klone der Transformation zum Animpfen einer Bakterienkultur verwendet und nach der abgeschlossenen Expression Bakterienlysate hergestellt. Der Immunoblot zeigt deutlich, dass im Fall einer AnxA1-Mutante die alleinige Rhamnose-Zugabe für die Induktion der Expression nicht ausreichte. Die Proteinexpression konnte ausschließlich durch die zusätzliche Induktion der Expression des orthogonalen tRNA/tRNA Synthetase Paares mittels Arabinose und der Zugabe von pBpa induziert werden.

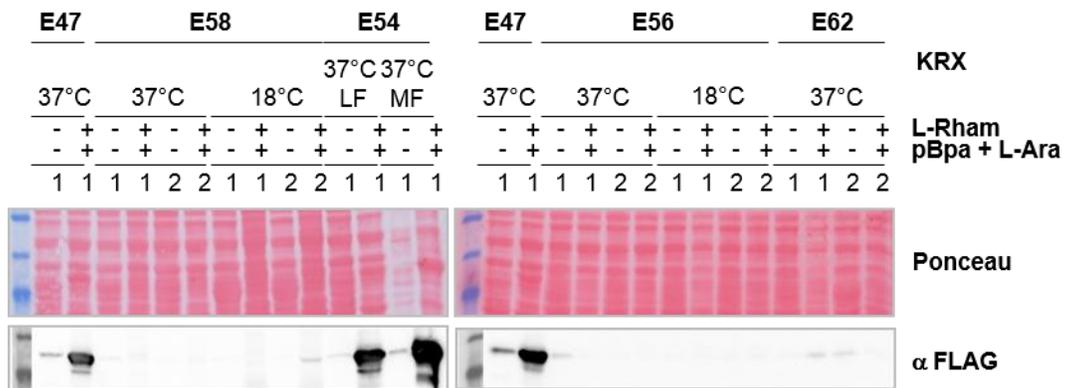
Im nächsten Schritt wurden alle erfolgreich klonierten, modifizierten AnxA1-Varianten im Bakterienstamm KRX exprimiert und vorerst nur die lösliche Fraktion analysiert. Wie in Abb. 4.2c zu sehen, konnten nur die Mutanten E54 und E55 erfolgreich exprimiert werden. Somit konnten nur zwei der bis dahin elf klonierten AnxA1-Varianten exprimiert und in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Um herauszufinden, warum die anderen AnxA1-Mutanten sich schlecht oder gar nicht exprimieren lassen, wurden im Anschluss auch die Membranfraktionen mittels Western Blot analysiert (Abb. 4.2d). Dabei wurde deutlich, dass die Abwesenheit von modifiziertem AnxA1 in der löslichen Fraktion diverse Ursachen haben kann. Für die AnxA1-Varianten E50 und E51 wird AnxA1 zwar generell exprimiert, jedoch handelt es sich dabei um ein verkürztes AnxA1, was an der geringeren Proteingröße zu erkennen ist. Zusätzlich führt die Verkürzung des Proteins zur nicht korrekten Faltung und der Ablagerung des Proteins in den *inclusion bodies*. Im Falle der AnxA1-Varianten E56 und E57, sowie E60, E61 und E62 hingegen ist die Induktion der Expression sehr schwach, da weder in der löslichen noch in der unlöslichen Fraktion große Mengen des rekombinanten Proteins detektierbar waren. Bei der Variante E58 kann eine starke Degradation des AnxA1 beobachtet werden, was sich in niedrigmolekularen Banden im Western Blot äußert. Die deutlich sichtbaren Banden von E47, E54, E55 und E74 zeigen dabei jeweils, auf welcher Höhe das vollständige AnxA1 regulär detektiert werden müsste. Aufgrund der Tatsache, dass viele AnxA1-Mutanten offenbar nicht mittels des bislang verwendeten AnxA1-Expressionsprotokolls (Promotionsarbeit Dr. Björn Linke, DKFZ Heidelberg) exprimiert werden konnten, wurden verschiedene Schritte zur Etablierung und Optimierung des Expressionssystems durchgeführt. Der erste Schritt bestand in der Reduktion der Expressionstemperatur von 37°C auf 18°C sowie der Verlängerung der Expressionsdauer von 3 auf 16 h (Abb.4.2e). Dies ist eine generelle Modifikation von Protokollen zur Proteinexpression, um insbesondere die korrekte Faltung des Proteins zu fördern^{170,171}. Exemplarisch sind in Abb. 4.2e

die Mutanten E56, E58 und E62 gezeigt, bei denen diese Anpassung jedoch zu keiner Verbesserung der Menge des rekombinanten AnxA1 in der löslichen Fraktion führte. E47 und E74 wurden als Positivkontrolle für das Expressionssystem selbst mitgeführt.

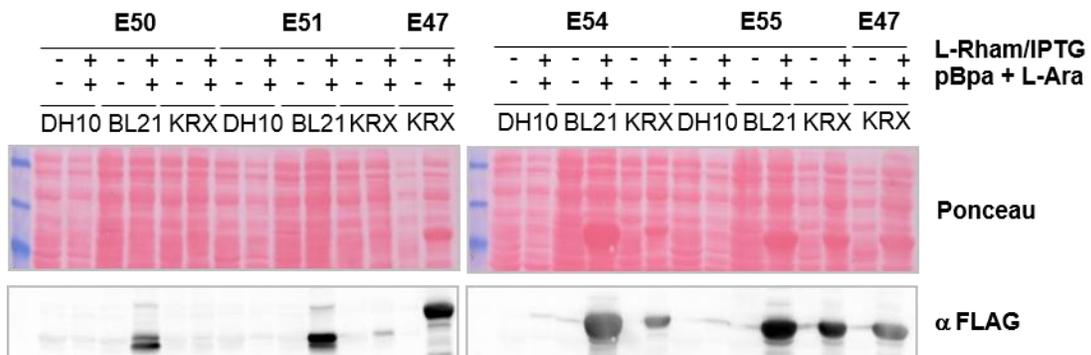


4 - Ergebnisse

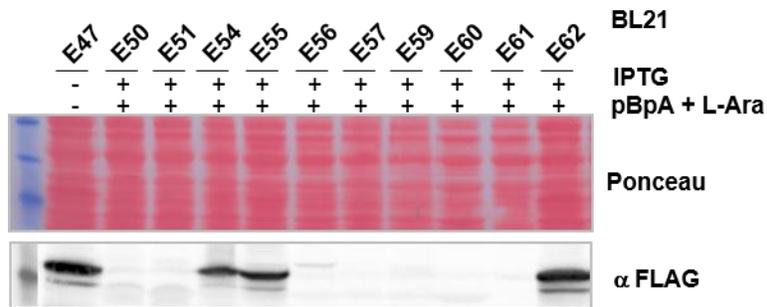
e



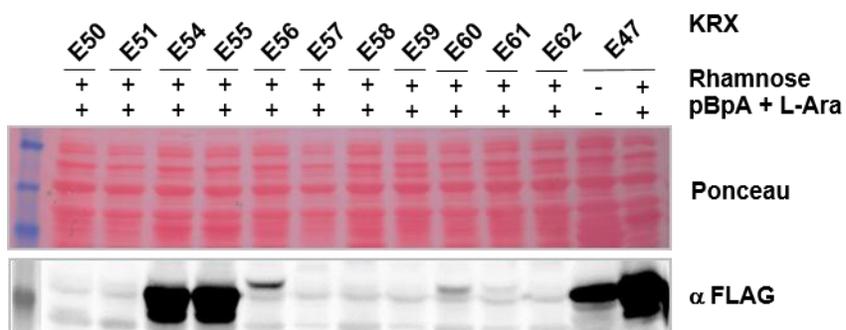
f

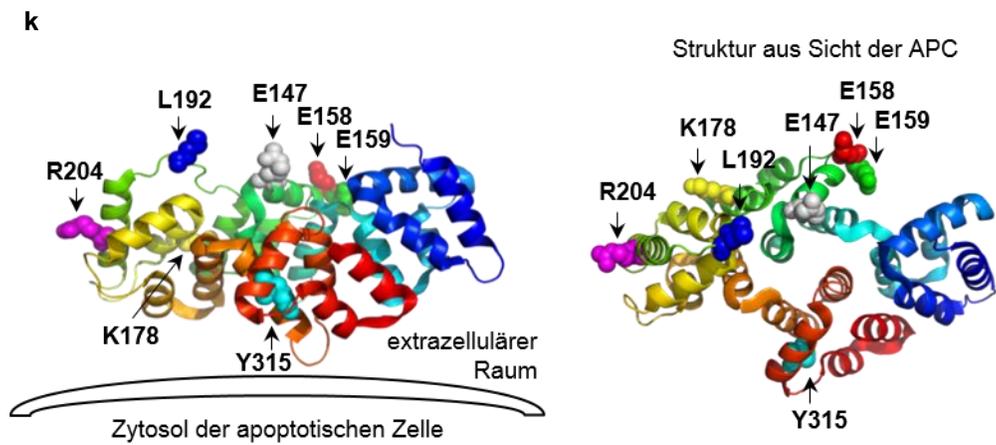
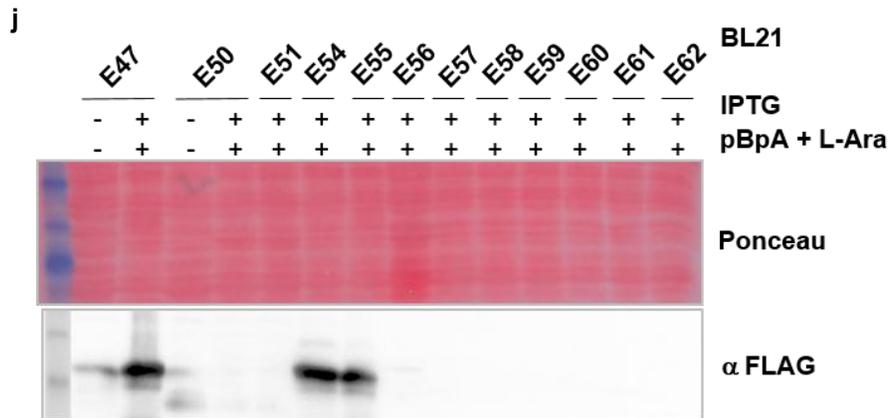
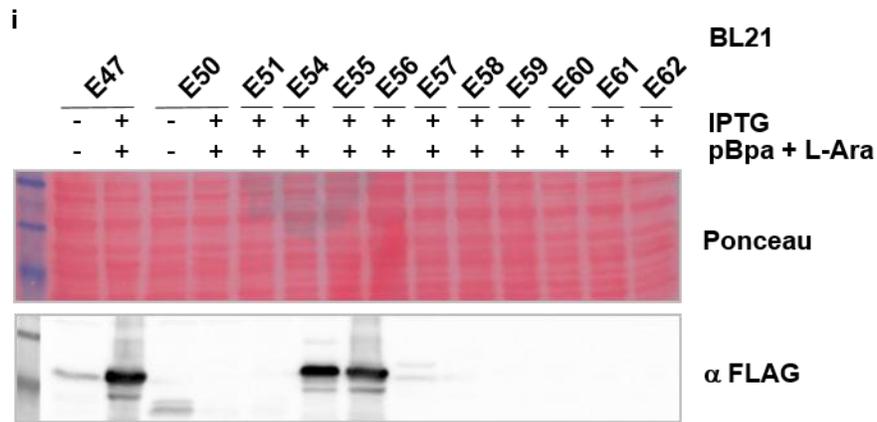


g



h





4 - Ergebnisse

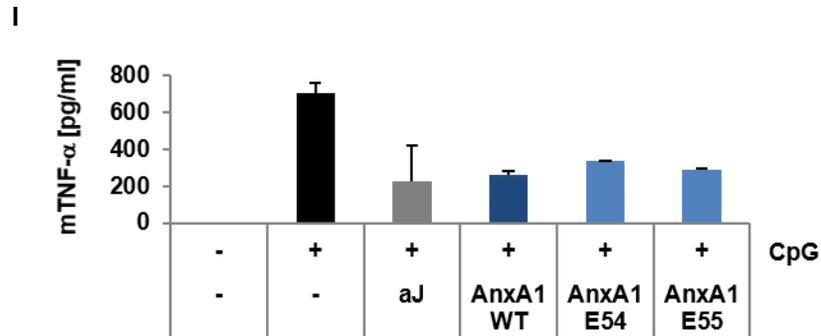


Abb. 4.2 - Etablierung der Expression von pBpa-AnxA1. a-j) WT oder pBpa-AnxA1 wurde in *E. coli* exprimiert. „1“ und „2“ repräsentieren jeweils zwei verschiedene Klone des Transformationsansatzes. 3 h nach Induktion der Proteinexpression wurden die *E. coli* lysiert und mittels Immunoblot hinsichtlich der AnxA1-Expression analysiert. Als Ladekontrolle dienten Ponceau-gefärbte Membranen, die anschließend mittels FLAG- oder LRP1-spezifischem Antikörper analysiert wurden. **a)** lösliche Fraktion (LF) und Membranfraktion (MF) der Expression von WT AnxA1 „B74“ in Gegenwart von pBpa im KRX-Stamm. L-Rham= L-Rhamnose, L-Ara= L-Arabinose. **b)** LF und MF der Expression der Mutante E55 mit pBpa. **c)** LF der Expression verschiedener Mutanten. **d)** Western Blot der MF der angegebenen AnxA1-Mutanten. **e)** Expression für 3h bei 37°C oder 16h bei 18°C. **f)** LF der Expression unter Verwendung der verschiedenen Bakterienstämme KRX, BL21, DH10B α (DH10). IPTG= β -D-thiogalactopyranosid. **g)** Zeitversetzte Zugabe von pBpa und Induktion der Expression im BL21-Stamm. **h)** Verringerung der pBpa-Konzentration während der Expression. **i)** Erhöhung des pH-Wertes von 6,8-7,4 auf 8. **j)** Reduktion der pBpa-Konzentration. **k)** Schematische Darstellung der mutierten Aminosäuren in der porkinen AnxA1-Struktur. Gezeigt sind die Mutanten, die in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden konnten. Übersicht der Expression aller klonierten Mutanten. **l)** Murine BMDC wurden mit je 500 nM WT AnxA1, den AnxA1-Mutanten E54 und E55 oder apoptotischen Jurkat T-Zellen (aJE6.1) vorinkubiert. Nach CpG-Stimulation über Nacht wurde die TNF- α -Konzentration mittels ELISA im Überstand gemessen.

Als nächstes wurden verschiedene genetische Hintergründe für die Proteinexpression mittels der Verwendung verschiedener Bakterienstämme (KRX, DHB10 α oder BL21) getestet (Abb. 4.2f). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die AnxA1-Mutanten E50 und E51 generell im BL21 Stamm und nicht in den Stämmen KRX oder DHB10 α exprimierbar sind. Allerdings handelte es sich dabei wieder um eine verkürzte Variante, was an einem verringerten Molekulargewicht im Vergleich zu E47 zu erkennen ist. Auch die restlichen Mutanten ließen sich durch diese Variation nicht besser exprimieren (Daten nicht gezeigt).

Ein weitere Strategie zu Optimierung der pBpa-AnxA1-Expression bestand darin, den chronologischen Ablauf der Proteinexpression zu verändern, indem die Induktion der Expression mittels L-Rhamnose/L-Arabinose und das pBpa nicht gleichzeitig, sondern im Abstand von mehreren Stunden hinzugegeben wurden. Die Zugabe von L-Rhamnose bzw. IPTG erfolgte sowohl im KRX als auch im BL21 Stamm somit drei Stunden vor der pBpa-Zugabe. (Abb. 4.2g und 4.2h).

In beiden Stämmen konnten jedoch außer bei den Mutanten E54 und E55 keine ausreichenden Mengen rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion detektiert werden.

In den vorangegangenen Expressions-Experimenten fiel auf, dass sich nach pBpa-Zugabe ein leichter Niederschlag in den Bakterienkulturen bildete. Daher könnte die geringe Löslichkeit und somit die Verfügbarkeit des pBpa ein Grund für die schlechte Exprimierbarkeit einiger Mutanten sein. Somit wurde der pH-Wert von 6,8-7,4 auf 8 erhöht, um die Löslichkeit des pBpa zu verbessern (Abb. 4.2i). Jedoch konnten auch mittels dieser Modifikation keine weiteren AnxA1 Mutanten in ausreichenden Mengen detektiert werden. Letztendlich wurde noch die Menge an zugegebenen pBpa verringert, da pBpa in einigen Fällen toxisch für die Bakterien sein kann¹⁷² (Abb. 4.2j). Aber auch diese Veränderung brachte keine weiteren exprimierbaren Mutanten hervor. Zusammengefasst ließen sich somit trotz diverser Optimierungsansätze der Proteinexpression nur die AnxA1-Mutanten E54 und E55 in ausreichenden Mengen exprimieren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden zusätzliche Mutanten kloniert, von denen sich wiederum nur drei Varianten exprimieren ließen (E88, E89, E315). Die räumliche Anordnung der pBpa-Positionen innerhalb der erfolgreich aufgereinigten AnxA1-Mutante sind schematisch in der 3D Struktur in Abb. 4.1k gezeigt. Dieses Schema zeigt das AnxA1 in der Calcium-gebundenen Form, so wie es an die Oberfläche apoptotischer Zellen bindet (links) bzw. aus der Sicht der APC (rechts).

4.2.3 pBpa-AnxA1 Mutanten supprimieren die TLR-induzierte TNF- α -Expression unverändert zum WT AnxA1

Für die Identifikation des Rezeptors, der die AnxA1-vermittelte Immunsuppression vermittelt, sollte das pBpa-modifizierte AnxA1 weiterhin suppressiv auf die TLR-induzierte Aktivierung in APCs wirken. Um dies zu überprüfen, wurden DC aus Knochenmarksvorläuferzellen (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) mit WT AnxA1 oder den pBpa-Mutanten E54 und E55 vorinkubiert und anschließend mit CpG stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die TNF- α -Konzentration im Überstand der Zellen mittels ELISA gemessen. Wie in Abb 4.2l zu sehen ist, konnte die CpG-induzierte TNF- α Sekretion in BMDC durch die Mutanten E54 und E55 genauso gut wie durch das WT AnxA1 supprimiert werden. Als Positivkontrolle für die generelle Suppressibilität wurden die BMDC analog zum AnxA1 mit früh-apoptotischen Jurkat T-Zellen vorinkubiert. Da die Mutanten unverändert suppressiv sind, wirkt sich der pBpa-Einbau in das AnxA1 nicht negativ auf dessen immunsuppressive Funktion aus und die Mutanten sollten potentiell in der Lage sein, ihren Rezeptor zu binden.

4.3 Identifikation eines potentiellen AnxA1-Rezeptors mittels UV-Kreuzvernetzung

4.3.1 Etablierung der UV-Kreuzvernetzungs-IP mit pBpa-AnxA1 in Raw264.7

Die kovalente Bindung zwischen dem pBpa-AnxA1 und seinem potentiellen Rezeptor benötigt UV-A Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 356 nm. Als erstes wurden deshalb die optimalen Versuchsbedingungen in Bezug auf Temperatur, Zeit und Bestrahlungsmedium für diese UV-Bestrahlung ermittelt (Abb. 4.3a). Das Bestrahlungsmedium sollte möglichst kein Serum enthalten, um Kreuzvernetzungen mit Serumproteinen auszuschließen, weshalb serumfreies Medium verwendet wurde. Als eine weitere Alternative wurde PBS benutzt. Zur Ermittlung der Zellviabilität unter diesen Bedingungen wurden die Zellen mit PBS oder Medium über einen Zeitraum von 5-60 Minuten bei 356 nm bestrahlt.

Im Anschluss erfolgte eine Analyse mittels Durchflusszytometer, die Aufschluss über die generelle Zellviabilität infolge der Bestrahlung geben sollte. Hierfür wurde die PS-Exposition mittels AnxA5 als Marker für früh-apoptotische Zellen verwendet, sowie 7-AAD als Marker für apoptotische Zellen, deren Membranintegrität bereits zerstört ist. Wie in Abb. 4.3a zu erkennen ist, gab es keinen Unterschied der Zellviabilität zwischen PBS und serumfreiem Medium. Die doppelt negative (DN) Population betrug in beiden Fällen ca. 60% und nahm mit zunehmender Bestrahlungszeit stetig ab, während der Anteil an einzel- und doppeltpositiven Zellen zunahm.

Anschließend wurden Co-IPs mit Raw264.7 und den Mutanten E54 und E55, sowie dem WT AnxA1 durchgeführt und auch hier verschiedene Bestrahlungszeiten getestet. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Zellen während der Bestrahlung gekühlt werden sollten oder nicht, da durch die Bestrahlung eine deutliche Erwärmung der Zellen erfolgt. Bei beiden Varianten wurde anschließend gegen den FLAG-Tag des AnxA1 präzipitiert und FLAG im Western Blot detektiert (Abb. 4.3b).

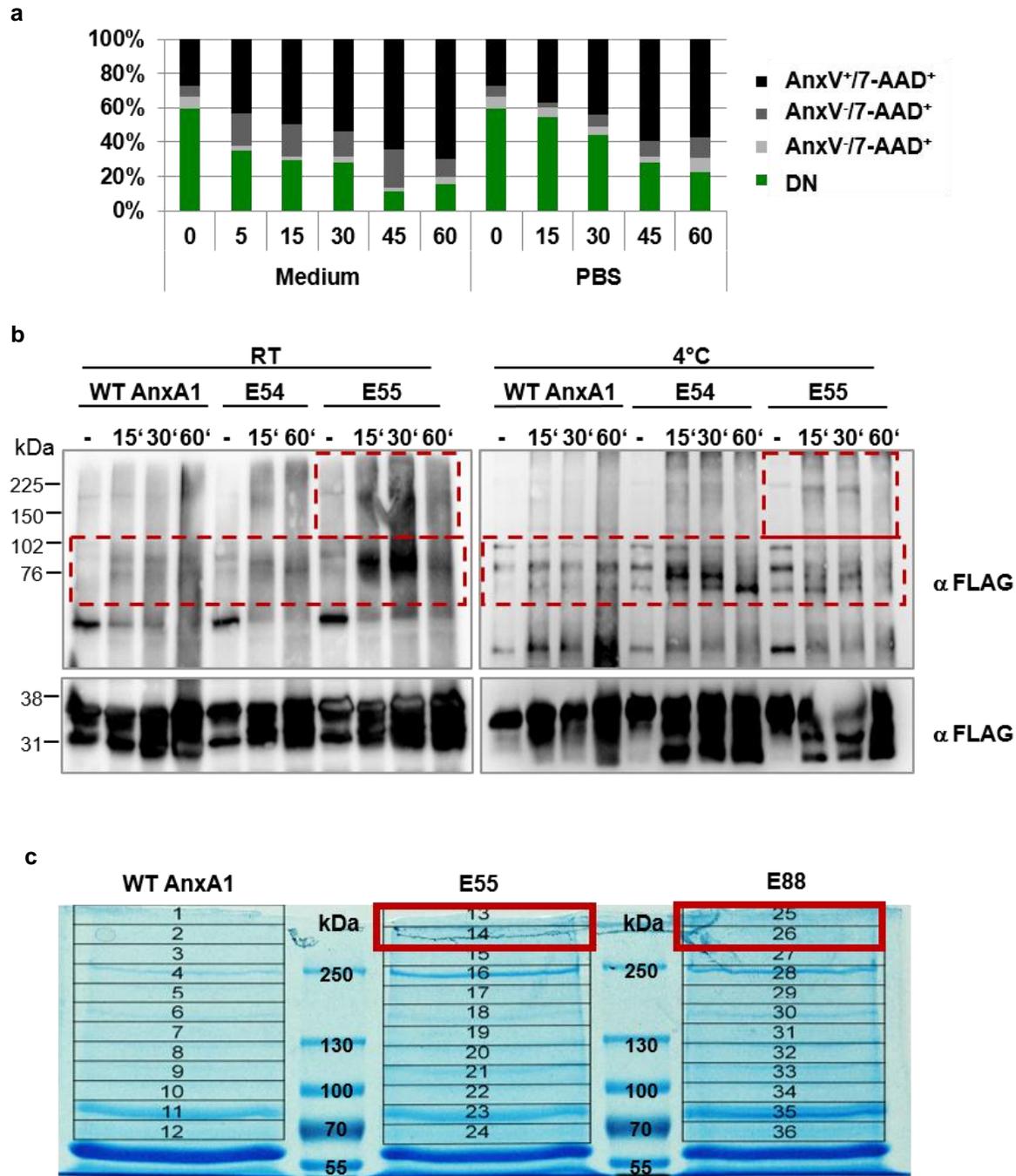


Abb. 4.3 - Etablierung der pBpa-Kreuzvernetzungs-IP mit Raw264.7. **a)** Raw264.7 wurden in PBS oder serum-freiem Medium für die angegebenen Zeiträume mit UV-A (365nm) bestrahlt und anschließend die Zellviabilität anhand der Bindung von AnxAV bzw. der Inkorporation von 7-AAD im Durchflusszytometer analysiert. DN= doppelt negativ für AnxAV und 7-AAD. **b)** Raw264.7 wurden mit WT AnxA1 oder den AnxA1-Mutanten E54 und E55 inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur oder auf Eis für die angegebenen Zeiträume bestrahlt. Im Anschluss wurde gegen FLAG präzipitiert und die IPs mittels Western Blot und anti-FLAG Nachweis analysiert. **c)** Coomassie-gefärbtes Gel der MS-Analyse 230 und dessen Fragmentierung.

4 - Ergebnisse

In allen Proben war auf der Höhe von ca. 37 kDa deutlich präzipitiertes AnxA1 zu erkennen, wobei sich das niedrigmolekulare Spaltprodukt, bei dem der N-Terminus abgespalten wird, mit zunehmender Bestrahlungsdauer anreichert. Sowohl bei der Bestrahlung auf Eis als auch bei der bei Raumtemperatur (RT) ist im Bereich zwischen 70 und 100 kDa ebenfalls eine Veränderung des Bandenmusters durch die Bestrahlung zu erkennen. Bei den bei RT bestrahlten Zellen, sind die Banden allgemein schlechter definiert. Dennoch zeigen beide Bestrahlungs-Varianten auch auf der Höhe von ca. 150-250 kDa eine Bande, die bei den Mutanten E54 und E55 nach 15 und 30 Minuten detektiert wird. Vor dem Hintergrund, dass ein kovalent gebundener AnxA1-Rezeptorkomplex vermutlich auf einer Höhe von 37kDa + x kDa laufen müsste, waren diese Banden interessante Kandidaten für die folgende MS-Analyse.

Basierend auf den Erkenntnissen dieser Vorversuche wurden 20 Minuten Bestrahlung auf Eis in Ca^{2+} -haltigen, serumfreien Medium als Parameter für die Bestrahlung gewählt, die im ersten Versuch mit der AnxA1 Mutante E54 durchgeführt wurde.

4.3.2 Identifikation von LRP1 als putativen AnxA1-Rezeptor mittels IP und anschließender MS-Analyse

Im Anschluss an die Vorversuche erfolgten anti-FLAG-IPs mit AnxA1 E54, E55 und E88-vorinkubierten Raw264.7 mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (MS-Analyse) um den putativen AnxA1-Rezeptor zu identifizieren. Als Kontrolle fungierte eine FLAG-IP mit Raw264.7, die nicht mit den AnxA1-Mutanten vorinkubiert wurden. Die IPs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele mit Coomassie gefärbt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden die Spuren des Gels jeweils in kleine, nummerierte Abschnitte unterteilt, so dass später nachverfolgt werden konnte, auf welcher Höhe das jeweilige Protein identifiziert wurde. Exemplarisch ist in Abb. 4.3c das Coomassie-gefärbte Gel der MS-Analyse der E55- und E88-IP gezeigt. Für die Analyse wurden alle Gelfragmente oberhalb von 50 kDa verwendet. Dies erfolgte zum einen, um die großen Mengen an AnxA1 und der schweren Antikörperkette des IP Antikörpers auszulassen, die womöglich andere Proteine überlagern würden. Zum anderen wurde angenommen, dass ein AnxA1-Rezeptorkomplex vermutlich größer als 50 kDa wäre, da AnxA1 selbst bereits 37 kDa groß ist. Die resultierende Liste der identifizierten Proteine aus der MS-Analyse wurde zunächst wieder nach den bereits genannten Kriterien analysiert. Es wurden alle RNA- und DNA-, sowie Zytoskelett-bindende Proteine ausgeblendet und dann danach sortiert, welche Proteine ausschließlich in der IP mit AnxA1 E54 enthalten waren.

Tabelle 4.3 - Übersicht der Ergebnisse der MS-Analysen 027, 044, 187 und 230. Dargestellt ist jeweils die Summe der einzigartigen Peptide, die in einer IP mit der angegebenen AnxA1-Variante identifiziert wurde. M2= Kontroll-IP ohne AnxA1 und mit anti-FLAG-Antikörper M2.

Summe einzigartiger Peptide			
Probe	Kontrolle	AnxA1	AnxA1 Mut
MS Analyse 027			
	M2	WT	
Annexin A1	5	38	
Nucleolin	5	16	
Stomatin	0	10	
MS Analyse 044			
	M2	WT	
Annexin A1	2	36	
Nucleolin	0	22	
Stomatin	1	15	
MS Analyse 187			
	M2		E54
Annexin A1	0		84
Nucleolin	45		58
LRP1	0		5
MS Analyse 230			
	M2	E55	E88
Annexin A1	3	288	292
Nucleolin	25	85	61
LRP1	1	21	26

Eine Übersicht der MS-Ergebnisse aller durchgeführten Analysen nach genannter Selektion ist in Tab. 4.3 dargestellt. Nach der Selektion blieb lediglich das membranständige LRP1 übrig, welches zwar nur mit fünf einzigartigen Peptiden in der AnxA1 E54-Probe nachgewiesen wurde, dafür jedoch in der Kontrolle abwesend war. Nucleolin hingegen war in dieser Analyse sowohl in der Kontrolle als auch in der AnxA1 Probe in großen Mengen detektierbar. Die anschließende IP mit den AnxA1-Mutanten E55 und E88 zur Bestätigung der Identifikation von LRP1 als AnxA1-interagierendem Protein ergab sogar ein deutlicheres Ergebnis. In diesen IPs wurden 21 bzw. 26 einzigartige LRP1-Peptide in der E55 bzw. E88 enthaltenen IP nachgewiesen, während sich lediglich ein Peptid in der Kontrolle finden ließ. Alle LRP1 Peptide wurden in den obersten zwei Gelfragmenten (Abb. 4.3c, Gelfragment 13 und 14, sowie 25 und 26) identifiziert, was ein Molekulargewicht von mehr als 260 kDa voraussetzt. Anhand der angegebenen AS-Sequenzen der LRP1-Peptide, konnten alle identifizierten Peptide der extrazellulären α -Kette des LRP1 zuge-

ordnet werden. Somit konnte mittels zweier unabhängigen Analysen mit drei verschiedenen pBpa-modifizierten AnxA1-Mutanten gezeigt werden, dass LRP1 spezifisch in der AnxA1-IP enthalten war.

4.4 Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion

4.4.1 LRP1-Expression in verschiedenen Zelltypen

Die Expression von LRP1 ist für verschiedene Zell- und Gewebetypen beschrieben. Zur Überprüfung, ob LRP1 tatsächlich sowohl in Raw264.7 als auch in den für diese Arbeit relevanten primären murinen BMDC und primären murinen Makrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDM) exprimiert wird, wurde RNA aus diversen humanen und murinen Zelltypen isoliert und die mRNA-Expression von LRP1 mittels qPCR überprüft (Abb. 4.4a). Dabei konnte gezeigt werden, dass LRP1 sowohl in humanen als auch in murinen APCs exprimiert ist und, dass Jurkat T-Zellen, sowie die humane, Makrophagen-ähnliche Zelllinie U937 auch nach PMA-Differenzierung wenig bis gar kein LRP1 exprimieren. MEF-2 dienten als Negativkontrolle, da in dieser murinen Fibroblastenzelllinie LRP1 deletiert wurde, während MEF-2 K4-Zellen mit humanem LRP1 rekonstituiert wurden und somit als Positivkontrolle dienen. Die humane Hepatozytenzelllinie Huh7 und die murine Hepatozytenzelllinie Hepa1-6 dienten als weitere Positivkontrollen. Aufgrund dieser Expressionsdaten sollten sowohl BMDM als auch BMDC prinzipiell LRP1 zu exprimieren.

Um die Expression an der Zelloberfläche zu überprüfen, wurden Durchflusszytometer-Analysen durchgeführt, bei denen mittels eines FITC-gekoppeltem anti-LRP1-Antikörpers gegen die α -Kette der extrazelluläre Teil des humanen LRP1 nachgewiesen werden kann (Abb. 4.4b). Auf humanen Monozyten, humanen BMDC und Raw264.7 konnte LRP1 deutlich nachgewiesen werden, während Jurkat T-Zellen, analog zu den mRNA Analysen, negativ für LRP1 waren. Bei den MEF-1 Zellen, die prinzipiell LRP1 haben sollten, war es wiederholt nicht möglich LRP1 an der Oberfläche nachzuweisen, so dass für diese Zellen auch kein Vergleich zu den LRP1-defizienten MEF-2 in Bezug auf die Oberflächenexpression möglich ist. Die LRP1-Defizienz konnte jedoch im Western Blot bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch für murine BMDC und BMDM gestaltete sich der LRP1 Nachweis wiederholt schwierig, so dass in der Regel keine eindeutig positive LRP1-Population im Vergleich zur Isotypkontrolle zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Da kommerziell nur ein guter FACS-Antikörper gegen humanes LRP1 erhältlich ist, wurde dieser für alle Färbungen verwendet.

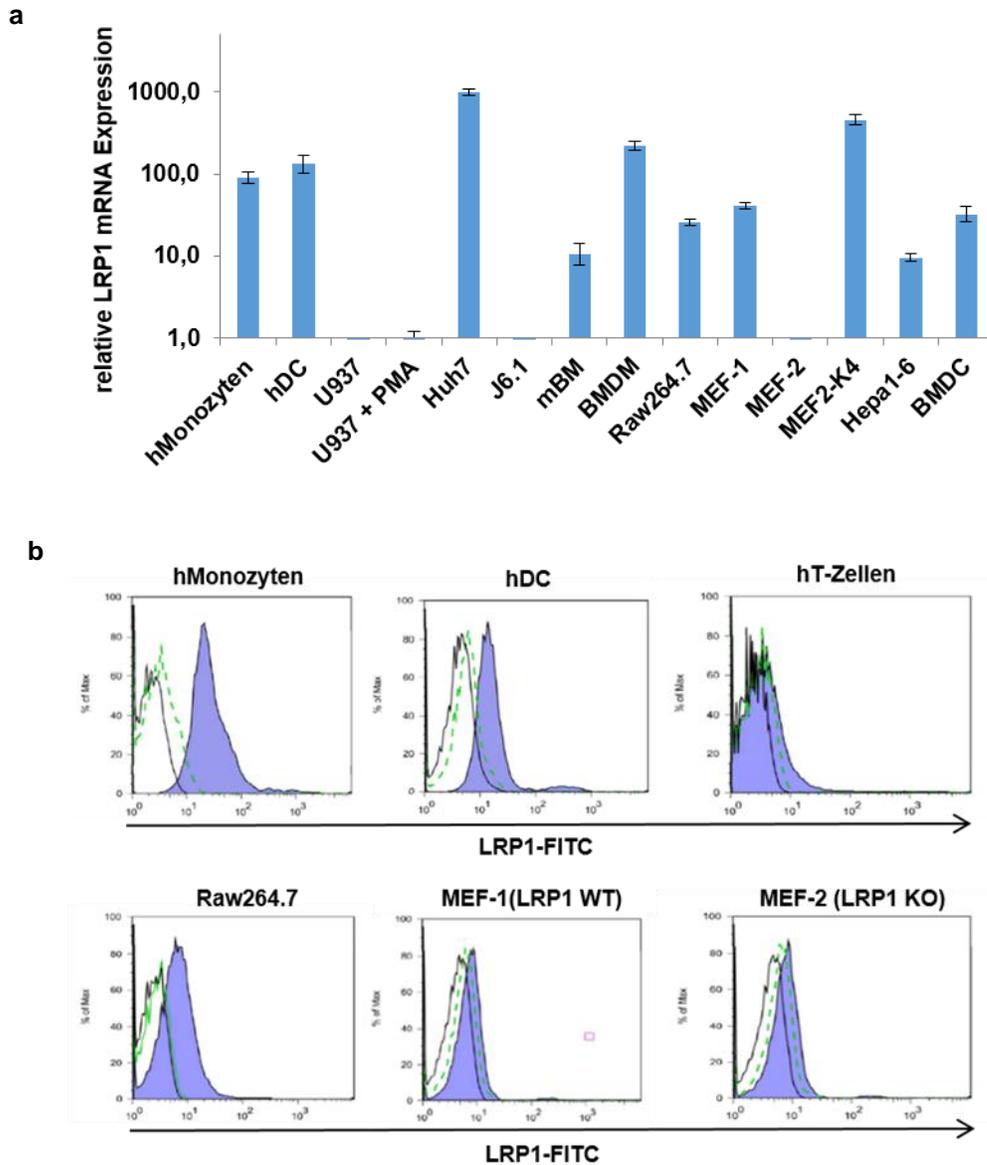


Abb. 4.4 - LRP1 Expression in verschiedenen Zelltypen. a) Aus den angegebenen Zellen wurde RNA isoliert und mittels qPCR die LRP1-Expression in Relation zu GAPDH ermittelt. h=human, m=murin, BM=*bone marrow*, BMDM=*bone marrow derived macrophages*, BMDC=*bone marrow derived dendritic cells*. **b)** Oberflächenexpression von LRP1 der angegebenen Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass LRP1 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf der Oberfläche von APCs exprimiert wird und diese Zellen somit prinzipiell in der Lage sind, AnxA1 mittels LRP1 zu binden.

4.4.2 Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion in Raw264.7 und primären Makrophagen mittels Co-IP

Nachdem gezeigt wurde, dass LRP1 in Raw264.7 exprimiert ist (Abb. 4.4a&b), wurde zur Validierung der MS-Ergebnisse eine erneute Kreuzvernetzungs-IP mit Raw264.7 und allen bis dahin verfügbaren AnxA1-Mutanten sowie WT-AnxA1 durchgeführt und mittels Western Blot analysiert (Abb. 4.5a). Für den LRP1-Nachweis wurde ein Antikörper gegen die intrazelluläre LRP1 β -Kette verwendet, da diese ebenfalls im LRP1-AnxA1 Komplex enthalten sein sollte und zur erleichterten Analyse im Western Blot nur 85 kDa anstatt 515 kDa groß ist. Zusätzlich wurde zur Überprüfung der anti-FLAG-IP selbst ein FLAG Nachweis durchgeführt. Dieser zeigt auf einer Höhe von ca. 37 kDa, dass AnxA1 prinzipiell präzipitiert wurde und dass insbesondere bei den Mutanten auf einer Höhe von ca. 100 kDa eine zusätzliche Bande nach Bestrahlung detektierbar war. Eine Ausnahme bildete hier die Mutante E315, sowie das zur Kontrolle mitgeführte WT-AnxA1, die keine zusätzlichen Banden aufwiesen. Bei allen AnxA1-Mutanten konnte mittels Nachweis der LRP1- β -Kette klar gezeigt werden, dass LRP1 nach 20-minütiger UV-A Bestrahlung co-präzipitiert. Ohne Bestrahlung war hingegen nur ein sehr schwacher Schatten auf gleicher Höhe detektierbar. Überraschend ist jedoch, dass auch WT AnxA1 durch die UV-Bestrahlung an LRP1 zu binden scheint, wenn auch deutlich vermindert. Interessanterweise zeigte die Co-IP mit der Mutante E315 reproduzierbar grundsätzlich den schwächsten LRP1-Nachweis.

Insgesamt konnte somit anhand der Co-IPs gezeigt werden, dass alle generierten pBpa-modifizierten AnxA1-Varianten nach UV-Bestrahlung mit LRP1 interagieren und validieren somit die Daten der MS-Analyse.

Zusätzlich zur der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie Raw264.7 sollte überprüft werden, ob sich die AnxA1-LRP1-Interaktion auch in primären Zellen reproduzieren lässt. Hierfür wurden BMDM exemplarisch mit der pBpa-Mutante E53 und WT-AnxA1 inkubiert, mit UV-A bestrahlt und danach eine anti-FLAG-IP durchgeführt. Im Anschluss wurde die Interaktion im Western Blot mittels AnxA1- und LRP1-spezifischer Antikörper analysiert (Abb. 4.5b). In der ersten Spur des Western Blots ist zu erkennen, dass UV-Strahlung in der Abwesenheit von AnxA1 nicht dazu führt, dass LRP1 den anti-FLAG Antikörper oder die Beads bindet. In der Kombination mit WT AnxA1 hingegen lässt sich analog zu den IPs in Raw264.7 eine schwache LRP1 Bande detektieren. Eine noch schwächere, kaum sichtbare LRP1-Co-IP ist mit der pBpa-Mutante E53 ohne UV-Bestrahlung detektierbar, die jedoch nach Bestrahlung deutlich verstärkt wird. Der FLAG-Nachweis innerhalb der gleichen IP zeigt, dass AnxA1 in den jeweiligen IPs präzipitiert wurde

und es in der Kombination von WT AnxA1 oder pBpa-AnxA1 mit UV-Strahlung offensichtlich zu einer Verminderung von Spaltprodukten des AnxA1 kommt.

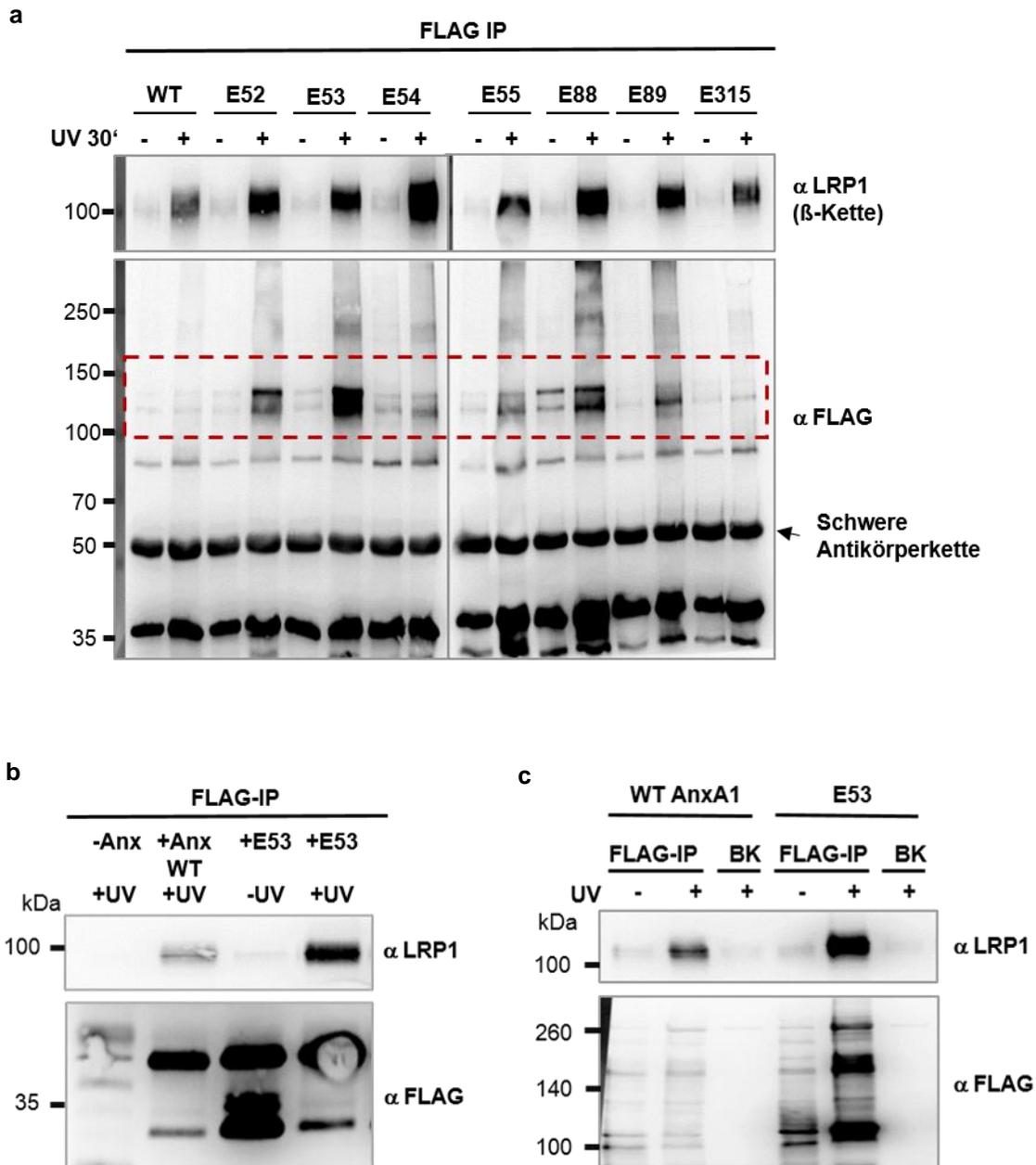


Abb. 4.5 - Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels IP. a) UV-Kreuzvernetzungs-IPs mit Raw264.7 mit allen exprimierbaren pBpa-AnxA1-Mutanten wurden mittels Immunoblot analysiert und sowohl LRP1 (β -Kette) als FLAG-AnxA1 nachgewiesen. **b)** und **c)** Primäre murine BMDM wurden mit der AnxA1-Mutante E53 inkubiert, bestrahlt und mit den Lysate eine FLAG-IP durchgeführt. Der Western Blot der IPs wurde mittels FLAG- oder LRP1-spezifischem Antikörper analysiert. BK = Beads Kontrolle.

In einem analogen Experiment wurde der Unterschied in Bezug auf die höhermolekularen Banden des FLAG-Nachweises zum WT AnxA1 noch deutlicher. Die Ausbildung dieser höhermolekularen Banden ließ sich nur in der Kombination von pBpa-AnxA1 mit UV-Bestrahlung erzielen, wie in Abb. 4.5c zu sehen ist. Wiederum bindet LRP1 nicht unspezifisch an die Beads in Abwesenheit des anti-FLAG Antikörpers wie die Kontrolle (BK) zeigt. Diese Ergebnisse ließen sich exemplarisch auch mit der pBpa-Mutanten E88 reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Somit interagiert AnxA1 nicht nur in Zelllinien, sondern auch in primären Zellen spezifisch mit LRP1 interagiert, was mit verschiedenen AnxA1-Mutanten bestätigt wurde.

4.4.3 Validierung der Interaktion von LRP1 mit AnxA1 im ELISA

Für die *in vitro* Validierung der IP-Daten wurden im Folgenden verschiedene Methoden etabliert. Zunächst wurde ein klassisches ELISA-basiertes Bindungsexperiment entwickelt. Hierfür wurde lösliches, aufgereinigtes LRP1 bzw. humanes oder murines AnxA1 an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und anschließend mit dem putativen Interaktionspartner (hAnxA1, mAnxA1, LRP1) oder den Kontrollen PRMT6, BSA inkubiert. PRMT6 wurde als Negativkontrolle verwendet, weil es ein ähnliches Molekulargewicht (~ 43kDa) wie das rekombinante AnxA1 (~39 kDa) und ebenfalls einen FLAG-Tag besitzt.

Als zusätzliche Positivkontrolle für die AnxA1-Bindung wurde Phosphatidylserin an die Platten gekoppelt, von dem bekannt ist, dass es AnxA1 bindet ⁸¹. Gebundene Interaktionspartner wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.6a).

Sowohl humanes als auch murines AnxA1 bindet konzentrationsabhängig an LRP1 und noch deutlich stärker an die Positivkontrolle PS (Abb. 4.6b). An BSA war keine Bindung nachweisbar (Abb. 4.6c). Umgekehrt konnte dies ebenfalls bestätigt werden, da LRP1 ebenfalls konzentrationsabhängig an gekoppeltes AnxA1 bindet (Abb.4.6d). Dabei scheint es mit etwas größerer Affinität an humanes als an murines AnxA1 zu binden und nicht an die Negativkontrollen PRMT6 oder BSA (Abb. 4.6c). Somit konnte die AnxA1-LRP1-Interaktion, sowie deren Spezifität mittels der eigens etablierten ELISA-basierten Bindungsstudien bestätigt werden.

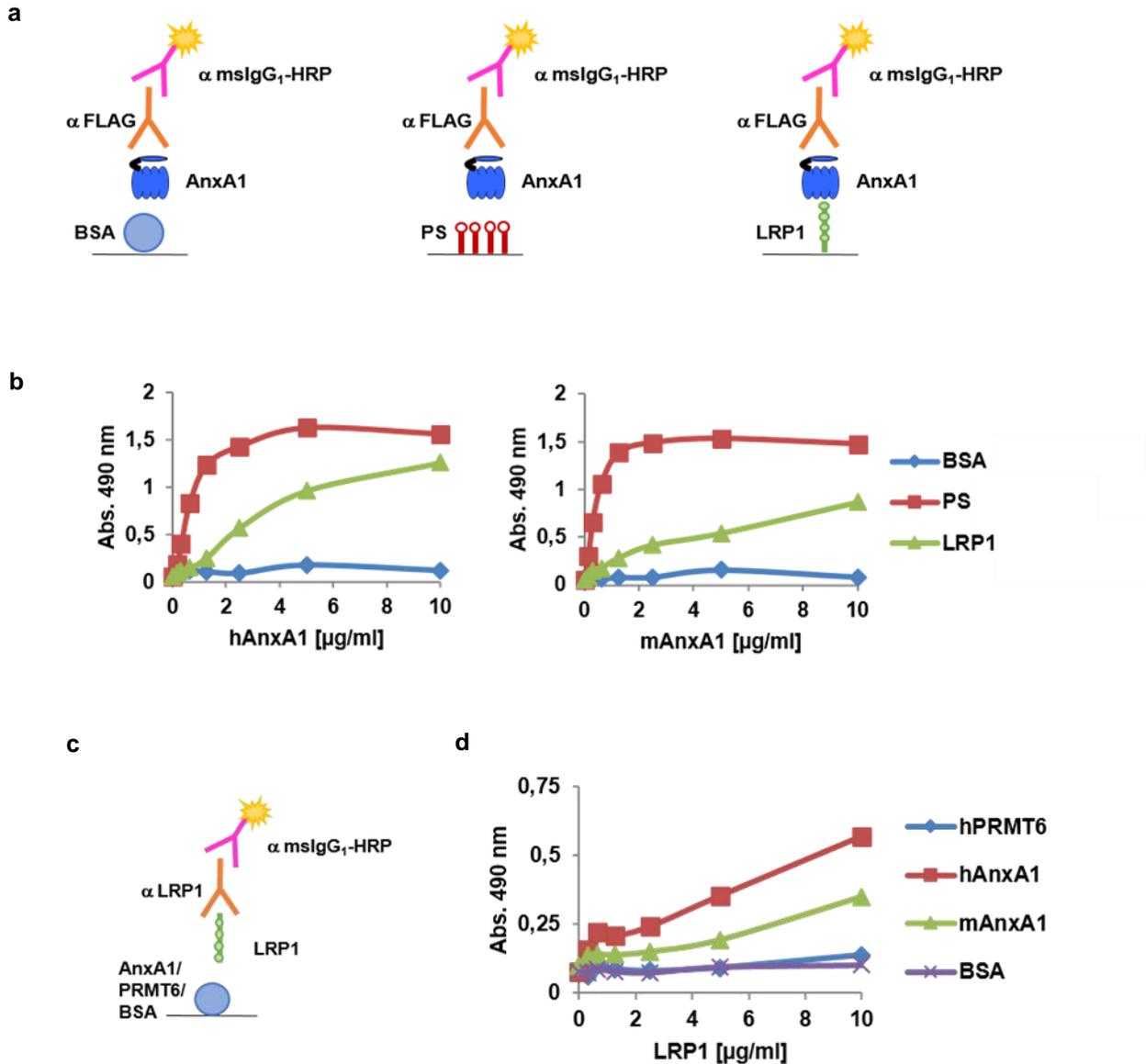


Abb. 4.6 - Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels ELISA. a) Schema der ELISA-basierten Bindungsstudien mit Platten-gebundenem Rezeptor. **b)** LRP1, Phosphatidylserin (PS) oder BSA wurden an Mikrotiterplatten gekoppelt und mit dem hAnxA1 oder mAnxA1 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels FLAG-spezifischem Antikörper. **c)** Schema der ELISA-basierten Bindungsstudien mit Platten-gebundenem Liganden. **d)** hPRMT6 oder hAnxA1 oder mAnxA1 oder BSA wurden an Mikrotiterplatten gekoppelt und mit hLRP1 inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels LRP1-spezifischem Antikörper.

4.4.4 Validierung der LRP1-AnxA1-Interaktion im Ligand/Rezeptor Blot

Eine weitere Methode zur Validierung von Protein-Protein-Interaktionen ist der sogenannte Liganden bzw. Rezeptor Blot. Diese Methode wurde in den frühen 1990er Jahren von Brown und Goldstein insbesondere für den Nachweis der Interaktion von sehr großen Proteinen wie LRP1 entwickelt¹⁸⁰. Die Technik basiert darauf, dass der meist kleinere Ligand mittels SDS-Page aufgetrennt und per Western Blot auf eine Membran übertragen wird. Im Anschluss wird diese Membran mit dem Interaktionspartner inkubiert und dessen Bindung mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.7a). In Abb. 4.7b wurde ein solcher Liganden-Blot durchgeführt, bei dem humanes und murines FLAG-AnxA1, sowie humanes AnxA1 ohne FLAG und das FLAG-Kontrollprotein PRMT6 sowie BSA aufgetragen wurden. Im Anschluss wurde die Membran mit LRP1 inkubiert und gebundenes LRP1 mittels eines LRP1-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Eine Interaktion von humanem und murinen AnxA1 und LRP1 konnte dadurch eindeutig bestätigt werden. Durch die nicht-vorhandene Detektion einer Bindung an PRMT6 konnte außerdem analog zu den ELISA-Daten bestätigt werden, dass die Interaktion FLAG-unabhängig ist.

In einem weiteren Liganden Blot wurde überprüft, ob LRP1 auch an murines AnxA5 bzw. AnxA13 und die murine AnxA1-Kerndomäne binden kann (Abb. 4.7c). Zusätzlich wurden wieder BSA als Negativ- und RAP als Positivkontrolle mitgeführt. Anhand dieses Blots ließ sich nachweisen, dass LRP1 neben AnxA1 zusätzlich auch an murines AnxA5 und AnxA13, sowie an die Positivkontrolle RAP aber nicht an BSA bindet.

Um diese Interaktion auch umgekehrt nachweisen zu können, wurden LRP1 und die Negativkontrolle BSA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, die anschließend mit humanem AnxA1 inkubiert wurde (Abb. 4.7d). Mittels anti-FLAG und anti-AnxA1 Antikörpern konnte hierbei ebenfalls eine Bindung von AnxA1 an LRP1, jedoch nicht an BSA nachgewiesen werden. Durch den Nachweis von AnxA1 in einer Bande auf der Höhe von ca. 500 kDa wurde bestätigt, dass AnxA1 an die α -Kette des LRP1 bindet und nicht an die bei 85 kDa sichtbare β -Kette (4.7e).

Zusammengefasst lässt sich sowohl mittels Ligand als auch Rezeptor Blot die Interaktion zwischen LRP1 und AnxA1 bestätigen und beweist, dass AnxA1 an die α -Kette des LRP1 bindet.

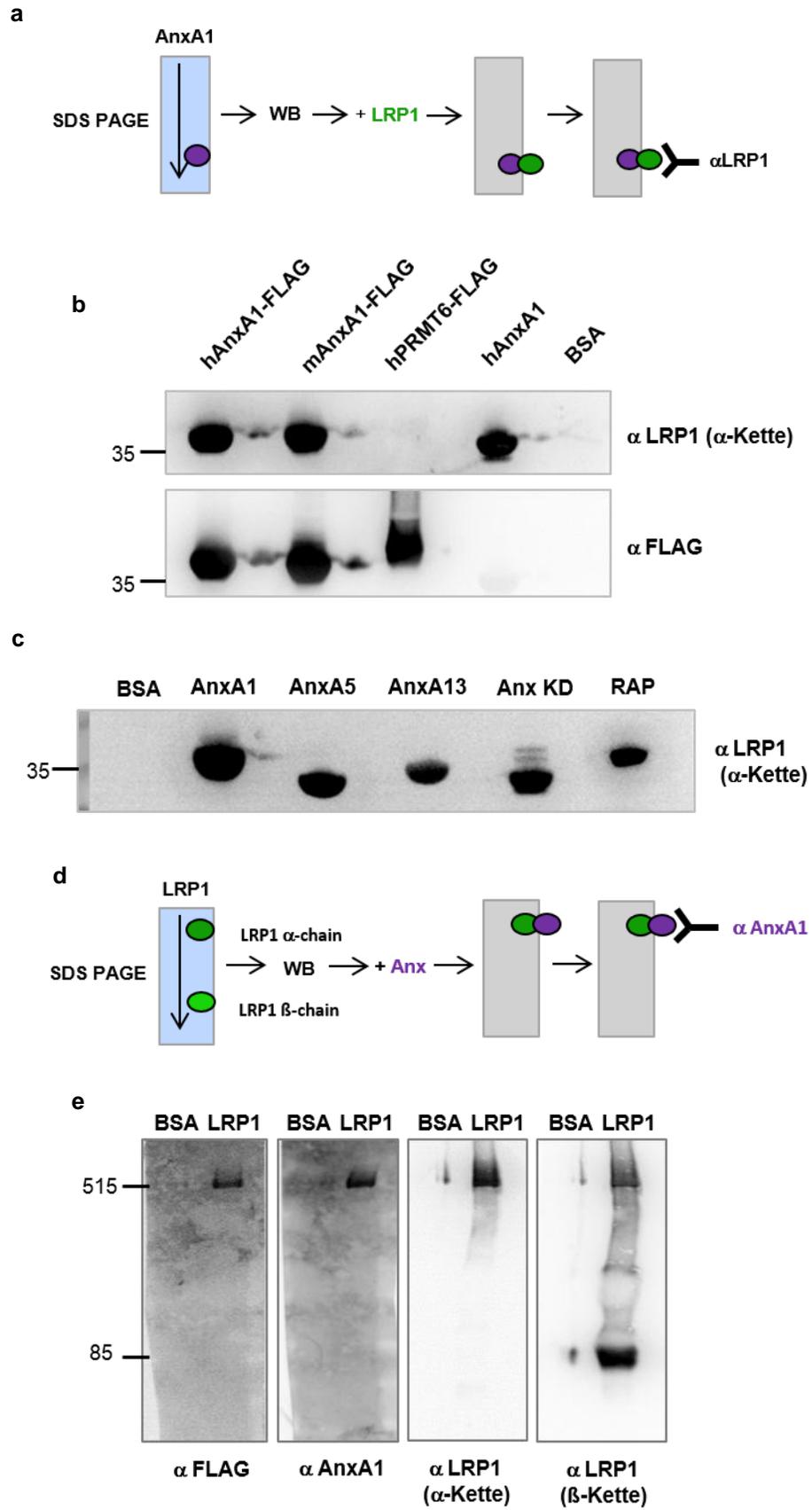


Abb. 4.7 - Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels Liganden und Rezeptor Blot. **a)** Schematische Darstellung des Liganden Blots. **b)** hAnxA1-FLAG oder mAnxA1-FLAG, sowie hAnxA1 ohne FLAG, BSA oder hPRMT6 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit hLRP1 inkubiert und gebundenes LRP1 mittels LRP1-spezifischem Antikörper nachgewiesen. **c)** Liganden-Blot angegebener muriner Annexine, BSA und RAP der mit LRP1 inkubiert wurde. **d)** Schematische Darstellung des Rezeptor-Blots. **e)** LRP1 und BSA, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit hAnxA1 inkubiert und gebundenes AnxA1 sowie beide LRP1-Ketten mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

4.5 Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Interaktion von LRP1 mit verschiedenen Annexinen

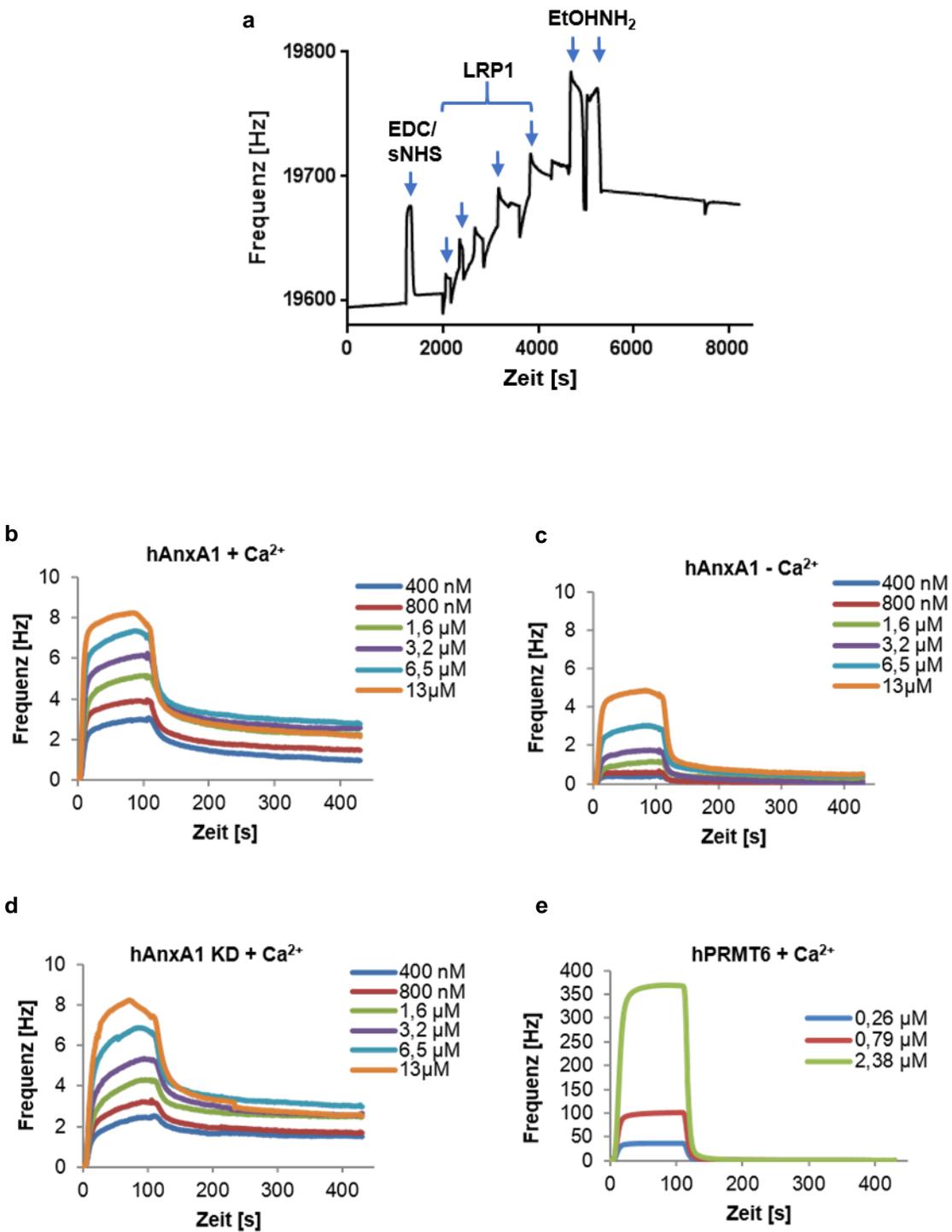
Zur weiteren Charakterisierung AnxA1-LRP1-Interaktion sollten mittels *Quartz Crystal Microbalance* (QCM)-Studien die Bindungsaffinitäten bestimmt werden.

Hierfür wurde ein Carboxyl-Chip verwendet, an den LRP1 über die Aminogruppen des Rezeptors kovalent gekoppelt wird. Dieser Chip wiederum besteht aus einem Kristall, der durch Anlegen einer Spannung in Schwingung versetzt und dessen Schwingungsfrequenz gemessen wird. Diese Frequenz verändert sich, wenn ein Ligand an das Chip-gekoppelte Protein bindet, und wird als Differenz der Frequenz angegeben. Diese Frequenzdifferenzen werden im Rahmen einer Kinetik gemessen. Während der Ligand über den Chip fließt, misst das System in Form der Frequenzdifferenzen wieviel Ligand an dem Chip gebunden bleibt und wieviel wieder dissoziiert. Daraus ergibt sich eine Kurve, die sich aus einer sogenannten Assoziationsrate, der „On-Rate“ (k_a), und einer Dissoziationsrate, der „Off-Rate“ (k_d), zusammensetzt. Mittels des Programms Tracetrader wurde aus dem Koeffizienten k_d/k_a die Bindungsaffinität in Form des K_D -Werts berechnet.

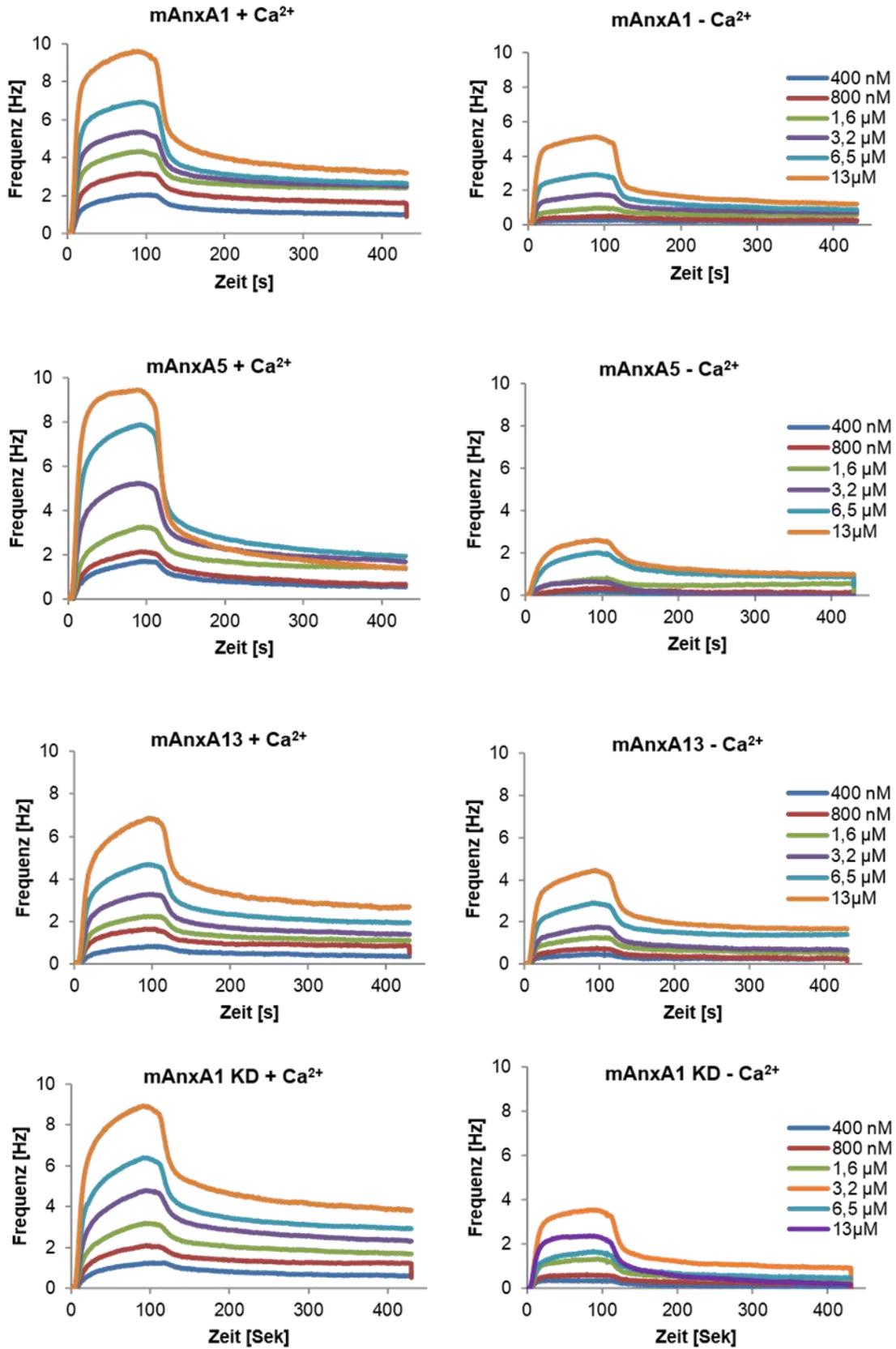
Insgesamt wurden zwei unabhängige Messungen mit zwei individuellen LRP1-Chips durchgeführt. Der erste Chip wurde vor allem genutzt, um die generellen Parameter der Messung des K_D -Wertes zu bestimmen. Dazu gehören Puffer, Konzentrationsbereiche und insbesondere auch die Regeneration, das heißt das Lösen von LRP1-gebundenem Annexin. Da sich das LRP1 bereits in einem Calcium-haltigen Hepes-Puffer (HBST) befindet, wurde dieser auch für das Koppeln des LRP1 an den Chip verwendet. In Abb. 4.8a ist repräsentativ das Koppeln des ersten Chips gezeigt. Nach Aktivierung des Chips erfolgten mehrere Injektionen von LRP1, dessen Bindung an den Chip eine Frequenzerhöhung bewirkt. Idealerweise sollte diese Erhöhung final in einem Bereich zwischen 70-120 Hz liegen. Sobald diese Frequenzerhöhung erreicht war, wurde zweimal Ethanolamin (EtOHNH_2) injiziert, um alle noch nicht abgedeckten reaktiven Car-

boxylgruppen abzusättigen. Dadurch liegt der Chip inert vor und alle im Anschluss über den Chip fließenden Proteine binden ausschließlich an das gekoppelte LRP1. Anschließend wurde das System in PBS umgepuffert, da sich die rekombinant hergestellten Annexine in PBS befinden. Die Puffer sind ein entscheidender Faktor, da minimale Unterschiede bereits sehr große Effekte auf die Messungen haben können. Um später die Calciumabhängigkeit der Bindung überprüfen zu können, wurde kommerziell erhältliches PBS mit und ohne CaCl_2 (1 mM) verwendet. Durch hier nicht gezeigte Testmessungen wurde ausgeschlossen, dass diese beiden Puffer an sich bereits Frequenzunterschiede bewirken. Ein weiterer entscheidender Schritt ist die Regeneration des LRP1 ohne dabei die LRP1-Struktur bzw. Faltung zu beeinflussen. Da sowohl für LRP1 als auch für Annexine eine Calcium-abhängige Bindung von Liganden beschrieben ist, wurde in einem der Testläufe überprüft, ob sich die Bindung durch Zugabe von 5 mM EDTA-Lösung wieder lösen lässt. Dies erwies sich als geeignete Variante, um LRP1 zu regenerieren. Die minimalen verbliebenen Reste an gebundenem AnxA1 konnten mittels 3M NaCl entfernt werden, sodass der Chip danach wieder die Ausgangsfrequenz erreichte. Der Konzentrationsbereich der Annexine wurde aufgrund der Vortests zwischen 400 nM und 13 μM gewählt und jede Konzentration in Triplikaten gemessen. Abb. 4.8b-e zeigen die Kurven basierend auf den Mittelwerten der Triplikate des humanen AnxA1 mit und ohne Calcium (Abb. 4.8b&c) und der humanen AnxA1-Kerndomäne mit Calcium (Abb. 4.8d), sowie des Negativkontrollproteins PRMT6 (Abb. 4.8e) mit Calcium. Analog dazu wurden auch alle zur Verfügung stehenden murinen Annexine in An- und Abwesenheit von Calcium gemessen (Abb. 4.8f). In Gegenwart von Calcium stieg bei allen gemessenen Annexinen die Frequenz so lange an, wie das jeweilige Annexin über den Chip floss. Danach fiel sie zunächst etwas steiler ab, bevor sich der Wert deutlich oberhalb der Ausgangsfrequenz einpendelte. Diese anhaltende Frequenzerhöhung steht für gebundenes Annexin und konnte durch die Zugabe von EDTA und anschließendem 3M NaCl wieder auf die Ausgangsfrequenz vor der Messung reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Je höher dabei die Konzentration des Annexins, desto größer wurde auch der Frequenzunterschied während der Assoziationsphase und desto höher die Frequenz, auf der die Kurve nach Ende der Annexin-Inkubation stagnierte.

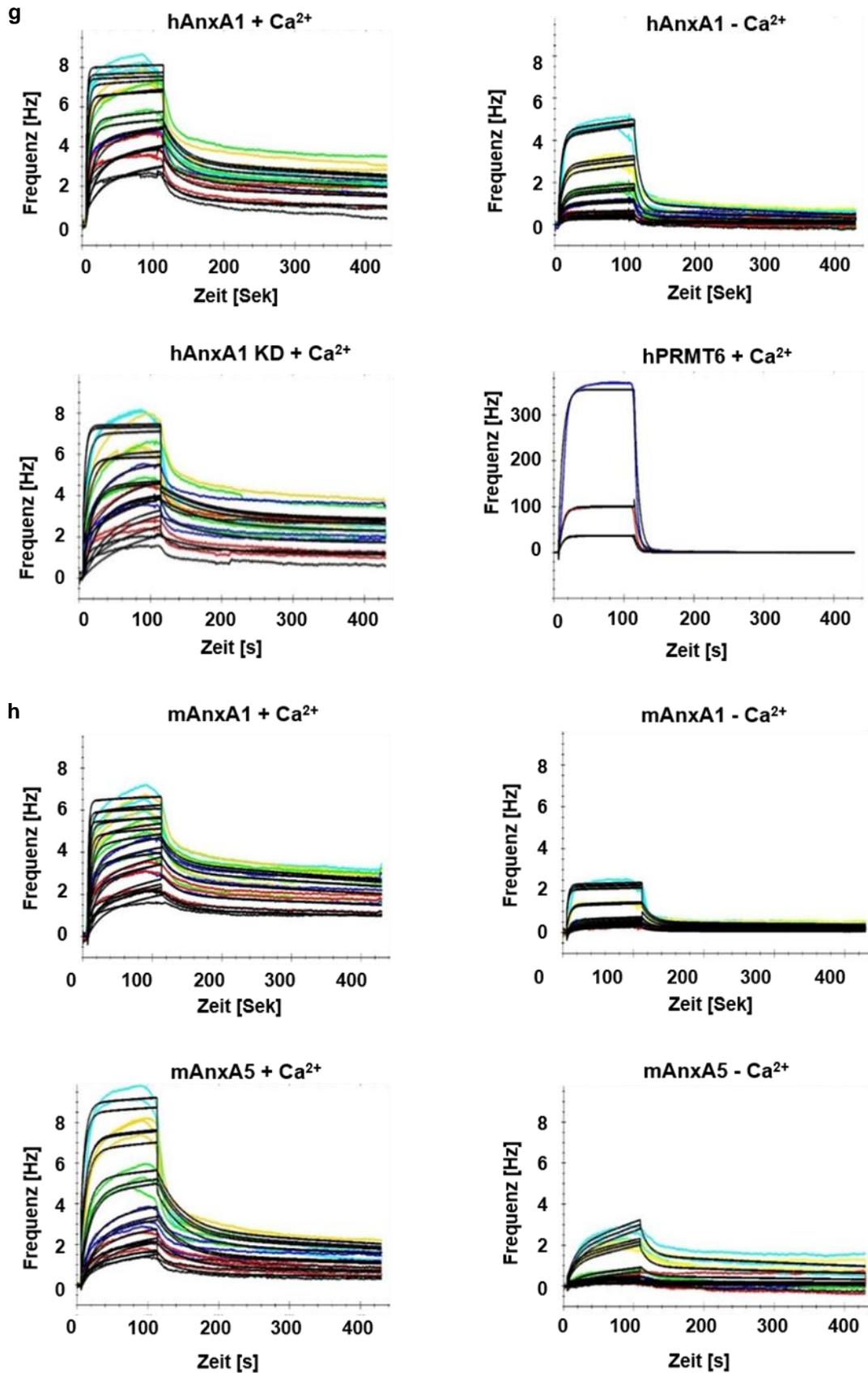
4 - Ergebnisse



f



4 - Ergebnisse



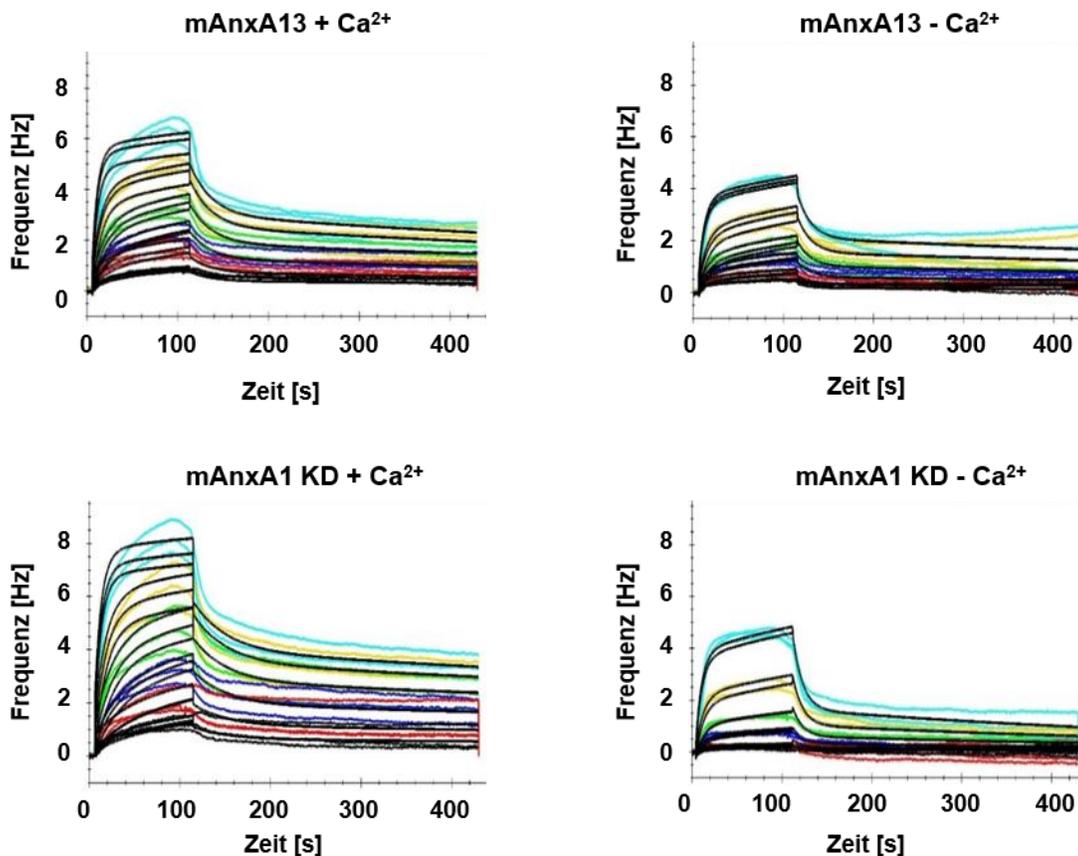


Abb. 4.8 - Bestimmung der Bindungsaffinitäten mittels *quartz crystal microbalance* Studien. a) Aufzeichnung der Frequenz des Chips während des Kopplungsvorgangs mit. Die Pfeile geben an, zu welchen Zeitpunkten die jeweiligen Substanzen auf den Chip injiziert wurden. EDC= 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, NHS= N-hydroxysuccinimid. b) Bindungskurve für hAnxA1 mit Calcium. c) Bindungskurve für hAnxA1 ohne Calcium d) Bindungskurve für die hAnxA1-Kerndomäne (KD) mit Calcium. e) Bindungskurve für hPRMT6 mit Calcium. f) Bindungskurven für murine (m) AnxA1, AnxA5, AnxA13 und die murine AnxA1-Kerndomäne (KD) in An- oder Abwesenheit von Calcium. g) *1:1 2 state* Fit (schwarze Kurven) der Bindungskurven des hAnxA1, der hAnxA1 KD und des hPRMT6 mit und ohne Calcium. Jede der schwarzen Kurven entspricht dem Fit für den Einzelwert einer Konzentration. h) *1:1 2 state Fit* (schwarze Kurven) der Bindungskurven aller gemessenen murinen Annexine.

Verglichen mit den Messungen ohne Calcium (Abb. 4.8b-e, rechts), ist der Unterschied zu den Calcium-haltigen Affinitätsmessungen offensichtlich. Neben einem insgesamt geringeren Anstieg aller Kurven fällt die Kurve deutlich steiler wieder ab und erreicht dabei fast die Ausgangsfrequenz. Dies lässt sich durch EDTA auch nur wenig beeinflussen und wird erst mittels NaCl-Injektion wieder auf Basislevel reduziert (Daten nicht gezeigt). Insgesamt spricht dies für eine schwächere Bindung von AnxA1 an LRP1. Im Vergleich zu der Negativkontrolle PRMT6 (Abb. 4.8e) wird jedoch ersichtlich, dass bei den Calcium-freien Messungen dennoch von einer schwachen Bindung gesprochen werden kann, da der Kurvenverlauf des PRMT6 beispielhaft für

4 - Ergebnisse

ein nicht-bindendes Protein ist. Der drastische Anstieg der Frequenz nach PRMT6-Injektion ist in diesem Fall sehr wahrscheinlich ein Pufferartefakt, da dieses Protein in einem anders zusammengesetzten PBS geliefert wird. Entscheidend an diesem Kurvenverlauf ist jedoch die Dissoziationsphase, die nach Beendigung der Injektion sofort wieder auf die Startfrequenz zurückfällt und prinzipiell sogar keine Regeneration benötigt. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass sowohl die humanen als auch murinen Annexine generell an LRP1 binden und dass die Affinität dieser Bindung stark Calcium-abhängig ist.

Mittels der Analyseprogramms „Tracedrawer“ wurden anschließend anhand der gemessenen Kurven die K_D Werte aus dem Koeffizienten k_d/k_a bestimmt. Für die Berechnung dieser Werte wurde ein sogenanntes „1:1, 2 state“ Modell verwendet. Dieses Modell beruht darauf, dass ein Annexin-Molekül an ein Molekül LRP1 in zwei verschiedenen Zuständen bzw. Konformationen binden kann. Der erste Zustand ist eine eher flüchtige, schwächere Bindung, während das Annexin langsam über den Chip fließt. Der zweite Zustand beschreibt eine gefestigte Bindung an LRP1, die eventuell auf einer Konformationsänderung des Anx basiert. Die Trendlinie dieser Berechnungen ist in den Kurvenverläufen in schwarz dargestellt (Abb. 4.8g).

Mit diesem Modell konnten die Kurven im Vergleich zu anderen Modellen am besten angepasst und K_D Werte berechnet werden, die in Tabelle 4.4 zusammengestellt sind. Sowohl AnxA1, als auch murines AnxA5, AnxA13 und die Kerndomäne besitzen in Gegenwart von Calcium K_D Werte im nanomolaren Bereich. Der Calciumentzug führt bei allen gemessenen Annexinen zu einer drastischen, teilweise zehnfachen Erhöhung der K_D Werte.

Tabelle 4.4 - Übersicht der anhand des 1:1 2 state Modells berechneten Assoziations- (k_a) und Dissoziationskonstanten (k_d), sowie der K_D -Werte, die sich aus dem Koeffizienten k_d/k_a ergeben.

PBS	+ Ca ²⁺				- Ca ²⁺			
	k_a [[1/M*s]]	k_d [1/s]	K_D [M]	Chi ² [%]	k_a [[1/M*s]]	k_d [1/s]	K_D [M]	Chi ² [%]
hAnxA1 KD	$1,7 \times 10^4$	$9,5 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-8}$	0,51	-	-	-	-
hAnxA1	$4,4 \times 10^4$	$3,1 \times 10^{-2}$	$9,4 \times 10^{-8}$	0,25	$6,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-6}$	0,05
mAnxA1 KD	$7,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-7}$	0,23	$3,8 \times 10^3$	$8,7 \times 10^{-2}$	$8,8 \times 10^{-6}$	0,04
mAnxA1	$3,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^{-2}$	$9,5 \times 10^{-8}$	0,16	$1,2 \times 10^4$	$8,6 \times 10^{-2}$	$7,9 \times 10^{-7}$	0,04
mAnxA5	$1,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^{-7}$	0,15	$3,8 \times 10^2$	$7,4 \times 10^{-2}$	$3,2 \times 10^{-5}$	0,07
mAnxA13	$9,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-7}$	0,12	$7,3 \times 10^3$	$5,8 \times 10^{-2}$	$9,8 \times 10^{-7}$	0,06
hPRMT6	$1,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-4}$	10,76	-	-	-	-

Am stärksten bindet die humane AnxA1-Kerndomäne mit einem K_D von 35 nM, während humanes und murines AnxA1 mit einer ähnlichen Affinität von ca. 95 nM binden. Murines AnxA5 und AnxA13 besitzen einen K_D im höheren nanomolaren Bereich und die Negativkontrolle PRMT6 spiegelt mit einem K_D von ungefähr 332 μ M deutlich ein tendenziell nicht-bindendes Protein wider. Die Chi^2 -Werte geben an, wie groß die Abweichung der berechneten *Fits* anhand des *1:1 2 state model* zu den Werten der Messung ist. Idealerweise sollte dieser Wert unter 10% liegen. Mit Ausnahme des PRMT6 befinden sich die Chi^2 -Werte sogar unter einem Prozent und zeigen somit eine sehr gute Korrelation der Messwerte mit den errechneten K_D -Werten.

4.6 AnxA1 supprimiert die TLR-induzierte Aktivierung in LRP1 KO BMDM

Nachdem die Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 umfassend biochemisch validiert und charakterisiert wurde, sollte im Anschluss die Funktion der Interaktion identifiziert werden. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob LRP1 der Rezeptor ist, der die AnxA1-basierte Immunsuppression auf BMDC vermittelt. Da die Interaktion bislang sowohl in Raw264.7 als auch in BMDM gezeigt werden konnte, stellte sich zunächst die Frage, ob BMDM deshalb genau wie BMDC durch AnxA1 supprimiert werden können. Hierzu wurde im Vorfeld die Stimulierbarkeit und Supprimierbarkeit von primären murinen BMDM überprüft. AnxA1-vorinkubierte Zellen wurden mit CpG stimuliert, um anschließend die IL-12 Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA messen zu können. Abb. 4.9a zeigt, dass sich primäre BMDM analog zu den BMDC konzentrationsabhängig mit CpG stimulieren und ebenfalls konzentrationsabhängig durch apoptotische Jurkat T-Zellen oder murines, rekombinantes AnxA1 supprimieren lassen. Dies konnte darüber hinaus auf mRNA-Expressionsebene mittels qPCR (Abb. 4.9b) bestätigt werden. Des Weiteren ist festzuhalten, dass AnxA1 allein, ohne Stimulation, keinen Einfluss auf die IL-12 Expression oder Sekretion besitzt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in BMDM somit die TLR-induzierte pro-inflammatorische Antwort ebenfalls durch AnxA1 supprimierbar ist, weshalb anschließend die Bedeutung von LRP1 in diesem Kontext analysiert werden sollte. Für diese Analyse standen BMDM-spezifische LRP1 knock out (LRP1 KO) Mäuse zur Verfügung, in denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des BMDM-spezifischen Lysozym M (LysM) Promotor steht. Durch die Rekombination mit flox-LRP1 werden Exon 1 und 2 des LRP1 herausgeschnitten und die Genexpression dadurch verhindert.

4 - Ergebnisse

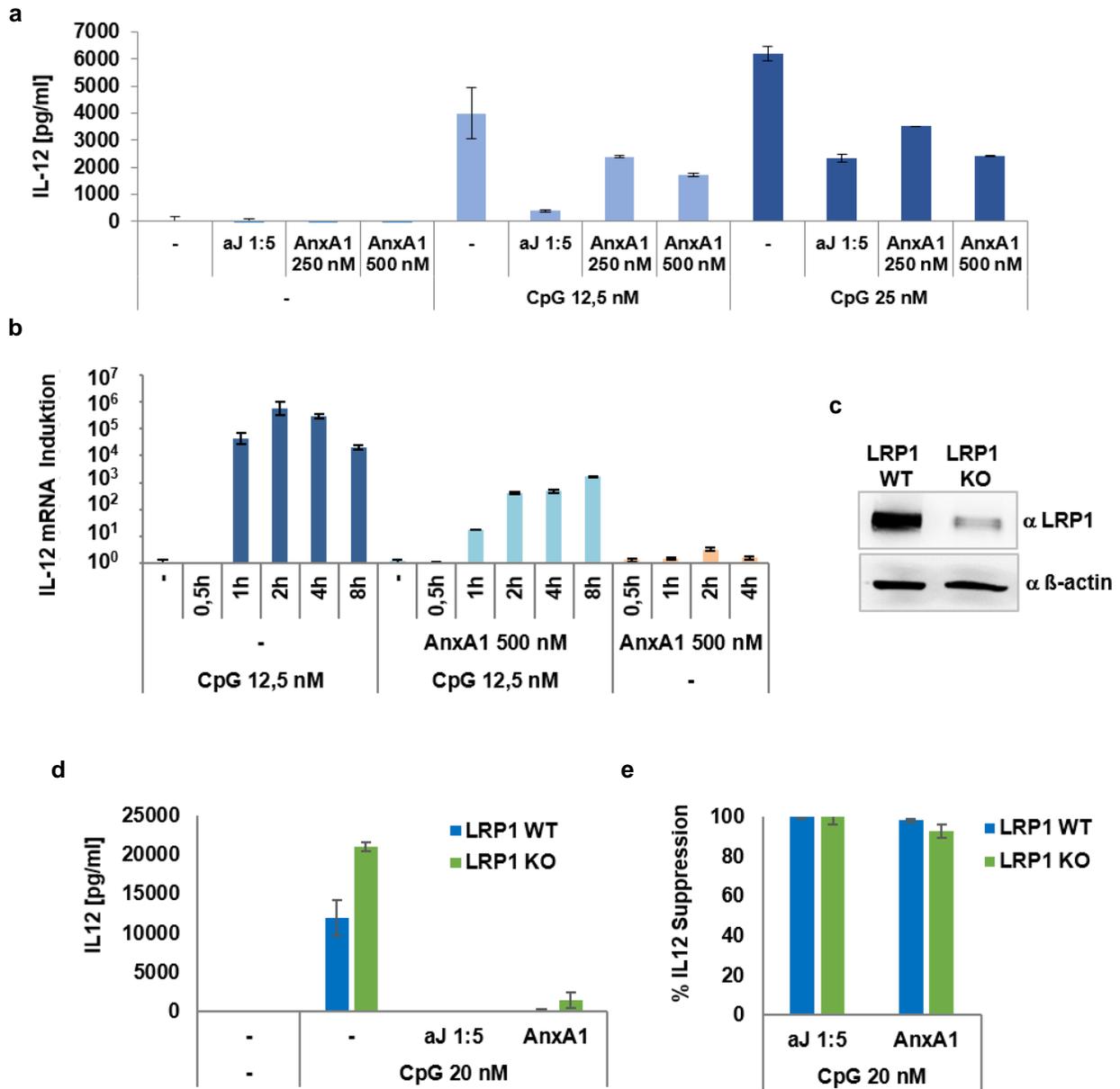


Abb. 4.9 - AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-induzierte Aktivierung in primären murinen BMDM.
a) BMDM wurden über Nacht mit AnxA1 inkubiert und anschließend für 24h mit CpG stimuliert. Die IL-12-Konzentration in den Zellüberständen wurde mittels ELISA gemessen. **b)** BMDM wurden mit AnxA1 vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeiträume mit CpG stimuliert. Die IL-12 mRNA wurde mittels qPCR relativ zu GAPDH gemessen. **c)** Western Blot der verwendeten BMDM-Lysate aus LysMCre-LRP1lox (LRP1 WT) und LysMCre+LRP1lox (LRP1 KO) Mäusen mit LRP1 (β-Kette)-Nachweis. **d)** LRP1 WT- oder KO-BMDM wurden mit AnxA1 vorinkubiert und mit CpG stimuliert. Die IL-12-Konzentration der Zellüberstände wurde anschließend mittels ELISA gemessen. **e)** Relative Suppression von (d).

Aus dem Knochenmark dieser Mäuse wurden BMDM generiert und die IL-12 Sekretion zwischen LRP1 WT und LRP1 KO BMDM in einem Suppressionsexperiment verglichen (Abb. 4.9d). Dabei stellte sich heraus, dass die CpG-induzierte IL-12 Sekretion sowohl in WT als auch in LRP1-KO BMDM durch AnxA1 supprimierbar ist. Der Western Blot der BMDM-Lysate dient als Kontrolle für den LRP1 KO in den verwendeten BMDM (Abb. 4.9c). Da die Stimulation in LRP1-KO BMDM höher ausfiel als in WT Zellen, wurde zusätzlich die relative Suppression angegeben, die verdeutlicht, dass die relative AnxA1-vermittelte Suppression in BMDM LRP1 unverändert ist (Abb. 4.9e). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass LRP1 nicht essentiell für die AnxA1-vermittelte Immunsuppression der TLR-Aktivierung ist.

4.7 AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-Aktivierung in BMDC

Obwohl in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass BMDM und BMDC viele Eigenschaften teilen⁷¹, wäre es dennoch möglich, dass LRP1 in BMDC eine Rolle für die AnxA1-induzierte Immunsuppression spielt. Da bislang keine BMDC-spezifische LRP1 *knock out* Mäuse existierten, wurden diese mittels der kommerziell erhältlichen CD11cCre und LRP1lox Mäuse selbst generiert. Als Kontrolltiere dienten homozygote flox-LRP1 Mäuse, die keine Cre-Rekombinase exprimieren. Aus dem Knochenmark dieser Mäuse wurden BMDC differenziert und die LRP1-Expression mittels Western Blot Analyse überprüft (Abb. 4.10a). Der LRP1 KO betrug in der Regel ca. 90%. Während der Differenzierung zu BMDC entsteht auch ein geringer Prozentsatz Zellen, die keine BMDC sind und somit eventuell auch kein CD11c exprimieren. Diese Zellen wurden vorher nicht herausselektiert und sind vermutlich für die im Western Blot sichtbare, geringe Menge an LRP1 in den KO-Lysaten verantwortlich. Diese diese minimalen Restmengen LRP1 sind jedoch vernachlässigbar für das Gesamtergebnis. Die Mäuse wiesen keinerlei offensichtlichen Phänotyp in Form von Lymphadenopathie oder Splenomegalie auf, der auf eine Autoimmunerkrankung hinweisen würde (Daten nicht gezeigt).

Die LRP1 KO-BMDC wurden zunächst im Hinblick auf ihre generelle Stimulierbarkeit und Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen untersucht (Abb. 4.10b). Dabei stellte sich heraus, dass die LRP1 KO-BMDC konzentrationsabhängig ebenso wie WT BMDC mittels CpG stimulierbar sind und dass die IL-12-Sekretion durch apoptotische Zellen supprimiert wird.

4 - Ergebnisse

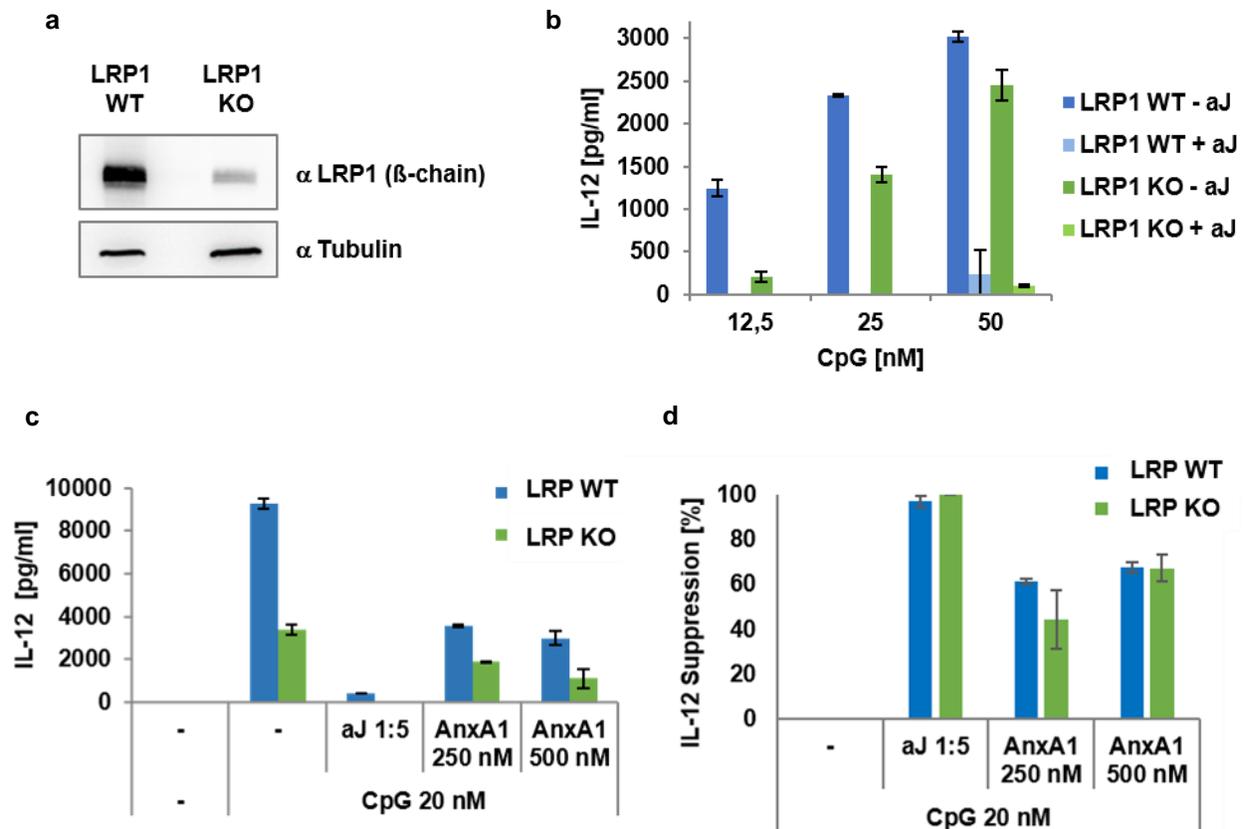


Abb. 4.10 –AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-induzierte Aktivierung in primären murinen BMDC.

a) Western Blot der BMDC-Lysate aus CD11cCre⁻LRP1lox (WT) und CD11cCre⁺LRP1lox (KO) Mäusen für die LRP1 β-Kette. **b)** BMDC wurden mit apoptotischen Jurkat T-Zellen (aJ) im Verhältnis BMDC: aJ 1:5 vorinkubiert und anschließend mit CpG stimuliert. Die IL-12-Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA gemessen. **c)** LRP1 WT- oder LRP1 KO-BMDC wurden mit AnxA1 vorinkubiert und mit CpG stimuliert. Die IL-12-Konzentration im Zellüberstand wurde anschließend mittels ELISA gemessen. **d)** Relative Suppression von (c).

Im nächsten Schritt wurde analog zu den apoptotischen Zellen die AnxA1-vermittelte IL-12-Suppression analysiert (Abb. 4.10c). Auch hier erwies sich AnxA1 als potenter Suppressor der pro-inflammatorischen Antwort und supprimierte die CpG-induzierte IL-12 Sekretion in LRP1 KO-Zellen genauso effizient wie in LRP1 WT-Zellen (Abb.4.10d).

Abschließend führen die Daten der Suppressionsexperimente zu dem Schluss, dass LRP1 auch in BMDC nicht für die AnxA1-vermittelte Immunsuppression verantwortlich ist.

4.8 Die Efferozytose in Makrophagen und DC, sowie MEF erfolgt unabhängig von AnxA1

LRP1 wurde insbesondere auf professionellen Phagozyten wie BMDM und BMDC im Kontext der Efferozytose beschrieben^{155,181}. Da AnxA1 an die Oberfläche von apoptotischen Zellen transloziert^{83,106,182}, sollte als nächstes die Interaktion von LRP1 mit AnxA1 im Zusammenhang mit der Aufnahme apoptotischer Zellen analysiert werden. Zusätzlich zu den professionellen Phagozyten wurde die Relevanz der LRP1-AnxA1-Interaktion auch auf nicht-professionellen Phagozyten in Form von MEF-Zellen untersucht werden.

Für die Studien zur Efferozytose wurden apoptotische Jurkat T-Zellen, die PS auf ihrer Oberfläche exponieren, zusätzlich mit murinem AnxA1 beschichtet, das an PS bindet. Im Vergleich zu apoptotischen Jurkat T-Zellen ohne zusätzliches AnxA1 konnte dadurch überprüft werden, ob eine erhöhte Konzentration von AnxA1 auf der Oberfläche der apoptotischen Jurkat T-Zellen einen Einfluss auf die Phagozytose dieser Zellen ausübt. Zuvor wurde außerdem ausgetitriert, in welchem Verhältnis die apoptotischen Jurkat T-Zellen mit den BMDC bzw. BMDM inkubiert werden müssen, um im Rahmen einer Kinetik einen linearen Anstieg der Phagozytose messen zu können (Daten nicht gezeigt). Daraus resultierte ein ideales Verhältnis der apoptotischen Jurkat T-Zellen zu BMDM von 0,25-0,5:1 bei BMDM sowie 1-2:1 für BMDC. Die apoptotischen Jurkat T-Zellen wurden vor der Apoptose-Induktion mit dem lipophilen blauen Farbstoff DiD gefärbt, so dass die Phagozytoserate im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse anhand von blau-fluoreszierenden Phagozyten gemessen werden konnte. Die zusätzliche Menge an AnxA1 in Relation zu den nicht AnxA1-gekoppelten Jurkat T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und ist repräsentativ für alle Experimente in Abb. 4.11a dargestellt.

In BMDM & BMDC nimmt der prozentuale Anteil phagozytischer Zellen sowohl bei LRP1 WT als auch bei LRP1 KO-Zellen im Verlauf der Zeit zu (Abb. 4.11b&c). Dennoch ist generell kein Unterschied in der Phagozytoserate zwischen LRP1 WT- und KO-Zellen messbar. Auch die zusätzliche Beschichtung der apoptotischen Jurkats mit AnxA1 zeigt keinen Einfluss auf die Efferozytose in BMDM und BMDC (Abb. 4.11b&c). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Efferozytose in BMDM & BMDC unabhängig von der LRP1-AnxA1-Interaktion erfolgt.

Prinzipiell sind die meisten Zellen des Körpers in der Lage zu phagozytieren, auch wenn es professionelle Phagozyten wie Makrophagen und DC gibt^{7,183}. Zu den nicht-professionellen Phagozyten gehören unter anderem Fibroblasten, die ebenfalls in der Lage sind, zu einem gewissen Grad apoptotische Zellen aufzunehmen¹⁶⁰.

4 - Ergebnisse

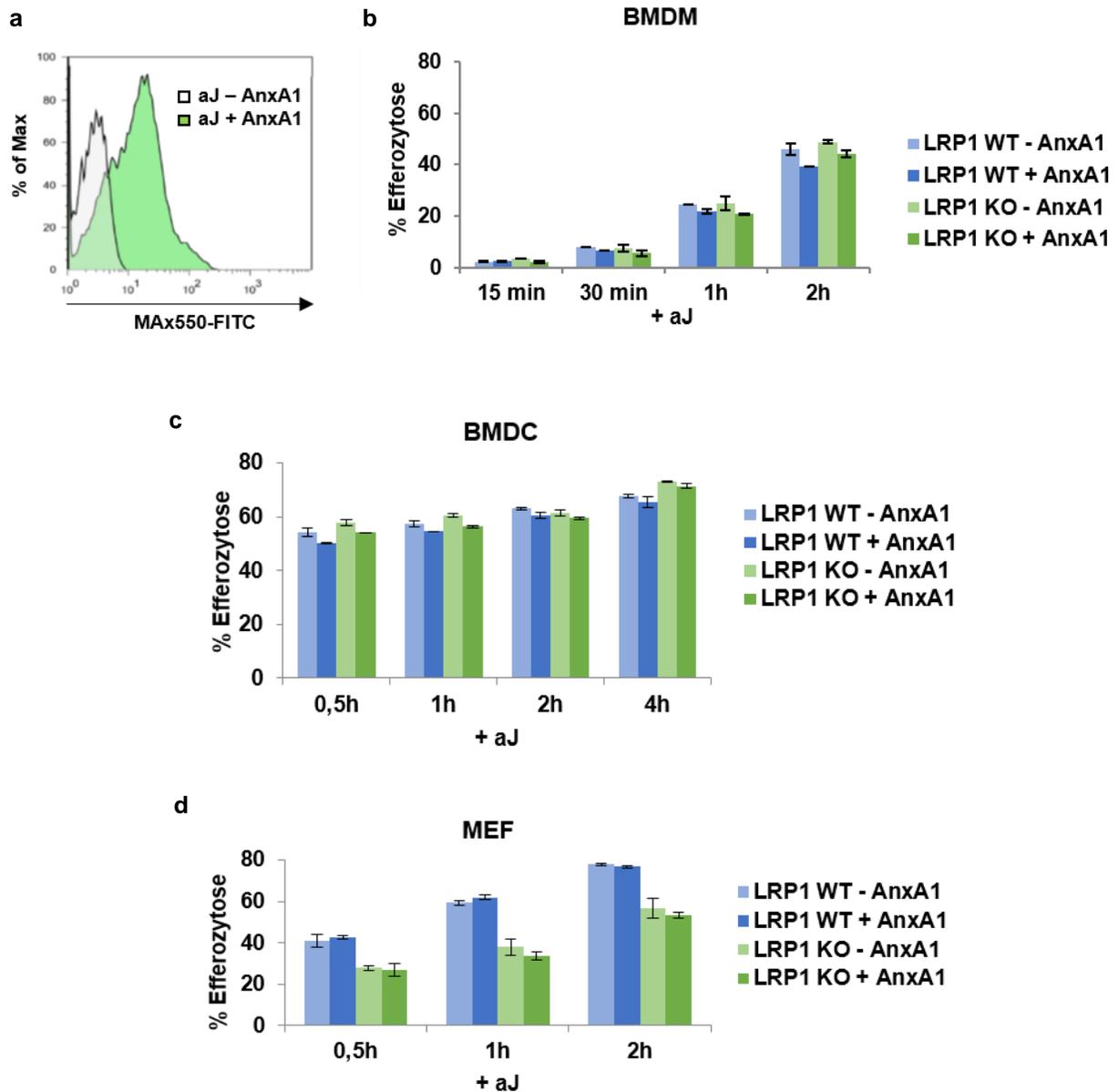


Abb. 4.11 - Die Efferozytose in professionellen und nicht-professionellen Phagozyten erfolgt unabhängig von AnxA1. a) Analyse der apoptotischen Jurkat Z-Zellen (aJ) im Durchflusszytometer. Die aJ wurden mit DiD-gefärbt und das zusätzliche gekoppelte mAnxA1 mittels MAx550-Antikörper gefärbt. Das Histogramm der DiD-positiven Population zeigt die aJ mit zusätzlich gekoppeltem mAnxA1 in grün im Vergleich zu den unbehandelten aJ in weiß. **b)** LRP1 WT- oder LRP1 KO-BMDM wurden mit DiD-gefärbten, apoptotischen Jurkat T-Zellen (aJ) im Verhältnis BMDM:aJ 1:0,5 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Efferozytoserate wurde anhand der DiD-positiven BMDM im Durchflusszytometer analysiert. **c)** LRP1 WT- oder LRP1- KO BMDC wurden mit DiD-gefärbten, apoptotischen Jurkat T-Zellen (aJ) im Verhältnis BMDC:aJ 1:1 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Efferozytoserate wurde anhand der DiD-positiven BMDC im Durchflusszytometer analysiert. **d)** LRP1 WT (MEF-1) oder LRP1 KO (MEF-2) wurden mit DiD-gefärbten, apoptotischen Jurkat T-Zellen (aJ) im Verhältnis MEF:aJ 1:5 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Efferozytoserate wurde anhand der DiD-positiven MEF im Durchflusszytometer analysiert.

Mit MEF-1 und MEF-2 existieren zwei Zelllinien, die entweder LRP1 besitzen oder LRP1-defizient sind. Anhand dieser beiden Zelllinien sollte die Bedeutung des AnxA1-LRP1-Komplexes im Kontext der Efferozytose analysiert werden. Wieder wurden DiD gefärbte, apoptotische Jurkat T-Zellen mit zusätzlichem AnxA1 gekoppelt und überprüft, ob AnxA1 einen Effekt auf die Efferozytose ausübt. Grundsätzlich konnte hier der bereits beschriebene Unterschied zwischen MEF-1 und MEF-2 festgestellt werden³⁹, da die LRP1 defizienten MEF-2 eine prinzipiell geringere Efferozytoserate aufweisen (Abb. 4.11d). In Bezug auf zusätzliches AnxA1 auf den apoptotischen Jurkat T-Zellen zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die Efferozytose in MEF, die somit auch in nicht-professionellen Phagozyten AnxA1-unabhängig verläuft.

4.9 Die Phagozytose von Beads durch in BMDC und MEF aber nicht in BMDM ist abhängig vom AnxA1-LRP1 Komplex

Die in dieser Arbeit verwendeten apoptotischen Jurkat T-Zellen exponieren vermutlich eine Reihe weiterer *eat me*-Signale¹⁵ und diese interferieren möglicherweise mit dem AnxA1-Signal bzw. der LRP1-abhängigen Phagozytose. Die isolierte Analyse eines *eat me*-Signals ermöglichen grün-fluoreszierenden Latex-Beads, die mit Proteinen jeglicher Art beschichtet werden können. An diese Latex-Beads wurde somit entweder murines AnxA1, das Negativ-Kontrollprotein PRMT6 oder die Positiv-Kontrolle CRT gekoppelt und die zu analysierenden Zellen mit diesen Beads inkubiert. Die Beads selbst wurden hinsichtlich der gekoppelten Menge Protein mittels Western Blot analysiert, der zeigt, dass gleiche Mengen Protein an die Beads gekoppelt waren und die Ergebnisse somit untereinander vergleichbar sind (Abb. 4.12a). Wenn Phagozyten Beads aufnehmen, kann die Phagozytoserate im Durchflusszytometer anhand der Menge der grün-fluoreszierenden Phagozyten gemessen werden. In BMDM ist jedoch kein Einfluss der AnxA1-beschichteten Beads sowohl in LRP1 WT- als auch in LRP1 KO-BMDM nachweisbar. (Abb. 4.12b).

Analog zu den BMDM wurde dieses Experiment auch mit BMDC durchgeführt. Die generelle Phagozytoserate der Beads in WT- und KO-Zellen ist sehr ähnlich. In LRP1 WT-BMDC ist eine Zunahme in der Phagozytoserate beider Sorten Beads zu beobachten, die jedoch für AnxA1-gekoppelte Beads stets größer ist als die der PRMT6-Beads (Abb. 4.12c).

4 - Ergebnisse

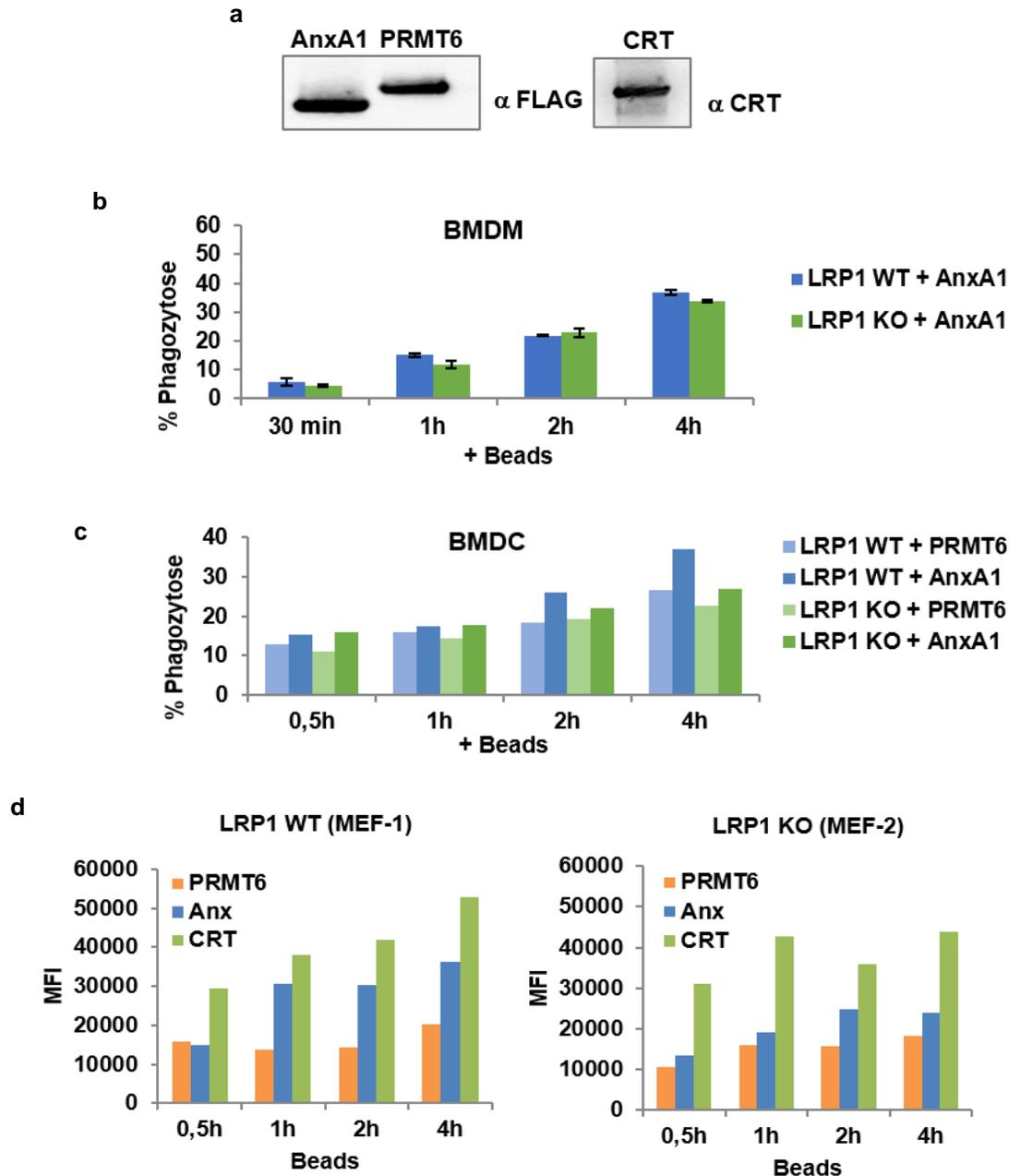


Abb. 4.12 –Die Phagozytose von Beads ist abhängig vom AnxA1-LRP1-Komplex. **a)** Immunoblot der verwendeten Beads. Der Nachweis für AnxA1- und PRMT6-Beads erfolgte mittels FLAG-Detektion, der CRT Nachweis mittels eines anti-CRT Antikörpers. **b)** LRP1 WT- oder LRP1 KO-BMDM wurden mit AnxA1-gekoppelten FITC-Beads inkubiert im Verhältnis BMDM:Beads 1:5 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Phagozytoserate wurde anhand der FITC-positiven BMDM im Durchflusszytometer analysiert. **c)** LRP1 WT- oder LRP1 KO-BMDC wurden mit AnxA1- oder PRMT6 gekoppelten FITC-Beads inkubiert im Verhältnis BMDC:Beads 1:10 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Phagozytoserate wurde anhand der FITC-positiven BMDC im Durchflusszytometer analysiert. **d)** LRP1 WT (MEF-1) oder LRP1 KO (MEF-2) wurden mit AnxA1-, PRMT6- oder Calreticulin (CRT)-gekoppelten FITC-Beads inkubiert im Verhältnis MEF:Beads 1:10 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Phagozytoserate wurde anhand der FITC-positiven BMDC im Durchflusszytometer analysiert.

Eine ähnliche Tendenz lässt sich auch bei LRP1 KO BMDC beobachten, wobei der Unterschied zwischen den phagozytierten AnxA1-Beads zu den PRMT6-Beads deutlich geringer ist. Wenn die Phagozytoserate der AnxA1-Beads in WT- mit denen in KO-Zellen verglichen wird, ist deutlich erkennbar, dass die Aufnahme in LRP1 WT BMDC höher als in KO-Zellen ist, während PRMT6-Beads sehr ähnlich phagozytiert werden. Insgesamt zeigen diese Daten, dass LRP1 in BMDC die Phagozytose von Beads beeinflussen kann und die Phagozytoserate LRP1-abhängig durch AnxA1 gefördert wird.

Auch in Bezug auf die Phagozytose von Beads sollten nicht nur professionelle, sondern auch nicht-professionelle Phagozyten analysiert werden, in dem MEF als Phagozyten dienen. Hier gab es zwei Arten von Kontroll-Beads: die Positivkontrolle beschichtet mit Calreticulin (CRT), beschrieben als Interaktionspartner von LRP1 auf MEFs im Efferozytosekontext ³⁹, und die Negativkontroll-Beads beschichtet mit PRMT6. Da die prozentuale Phagozytoserate der Beads in MEFs generell sehr niedrig war (Daten nicht gezeigt), ist in Abb. 4.12d die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. In MEF-1 Zellen wurden die PRMT6-Beads kaum phagozytiert, während AnxA1-Beads nach einer Stunde nahezu doppelt so effizient aufgenommen wurden. Nur die Positivkontrolle in Form der CRT-Beads wurde noch besser phagozytiert. Im Vergleich zu den MEF-2 Zellen lässt sich zunächst eine generell reduzierte Aufnahme aller drei Arten Beads feststellen.

Tabelle 4.5 – Relative Phagozytose der AnxA1- oder CRT-Beads. Die Werte geben den Koeffizienten aus der MFI der mit AnxA1- oder CRT-Beads inkubierten MEF-1 oder MEF-2 und der zugehörigen PRMT6-MFI an.

		Phagozytose relativ zu PRMT6	
Beads	Zeit	MEF-1	MEF-2
AnxA1	0,5 h	1,0	1,3
	1 h	2,2	1,2
	2 h	2,1	1,6
	4 h	1,8	1,3
CRT	0,5 h	1,9	2,9
	1 h	2,8	2,7
	2 h	2,9	2,3
	4 h	2,6	2,4

Dennoch wurden AnxA1-Beads in MEF-2 besser aufgenommen als PRMT6-Beads und lediglich CRT-Beads wiesen eine noch höhere Phagozytoserate auf. Vergleicht man nun die Phagozytose der AnxA1-Beads zwischen MEF-1 und MEF-2 ist eine deutliche Reduktion in den LRP1-defizienten MEF-2 zu sehen. Auch CRT-Beads werden nach 2 h weniger effizient von MEF-2 phagozytiert. Zur Verdeutlichung ist in Tabelle 4.5 die Phagozytose der AnxA1- oder CRT-Beads

4 - Ergebnisse

in Relation zu der PRMT6-MFI darstellt. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass LRP1 in MEF einen Einfluss auf die Phagozytose von AnxA1-Beads ausübt (Abb. 4.12d), der noch größer ist als der Effekt in BMDC (Abb. 4.12c).

5 Diskussion

Die effiziente Beseitigung apoptotischer Zellen ist ein essentieller Prozess und trägt zur Erhaltung der Homöostase eines Organismus bei. Physiologisch auftretende apoptotische Zellen werden mittels Efferozytose durch Phagozyten entfernt, ohne dabei eine Immunantwort auszulösen. AnxA1 wurde in diesem Kontext als eines der *eat me*-Signale auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle und somit als Efferozytose-fördernd beschrieben^{15,35}. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit rekombinantem AnxA1 die TLR-induzierte Aktivierung der DC *in vitro* inhibiert⁸³. Auch *in vivo* konnte unsere Gruppe zeigen, dass AnxA1 einen tolerogenen Phänotyp in DC induziert, was die Bedeutung von AnxA1 im Rahmen der Immunsuppression zusätzlich unterstreicht⁸³. Der molekulare Mechanismus hinter diesen Prozessen ist bislang jedoch noch nicht vollständig geklärt. Studien unserer Gruppe zeigten, dass die TLR-induzierte NF- κ B-Aktivierung inhibiert wird und dadurch die Expression pro-inflammatorischer Proteine supprimiert wird (Promotionsarbeit V. Jahndel, 2013). Die Schlüsselfrage in diesem Kontext war deswegen, welcher Rezeptor durch die Bindung von AnxA1 in der Lage ist, die Immunsuppression zu vermitteln. Mittels einer in dieser angewandten Form neuen UV- Kreuzvernetzungsmethode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig ein bislang unbekannter AnxA1-Rezeptor auf APC identifiziert und sowohl biochemisch als auch funktionell im Hinblick auf Immunsuppression und Efferozytose charakterisiert.

5.1 Identifikation von LRP1 als neuen AnxA1-Rezeptor

5.1.1 Auswahl der Modellzelllinie

In vorangegangenen Studien unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die bislang auf Monozyten beschriebenen Mitglieder der FPR-Familie nicht für die AnxA1-vermittelte Suppression auf DC verantwortlich sind (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Verschiedene methodische Ansätze führten jedoch nicht zur Identifikation eines suppressiven AnxA1-Rezeptors auf DC, was unterschiedliche Ursachen haben kann (Tab. 4.1). Denkbar wäre auch, dass grundsätzlich nur sehr wenige Rezeptormoleküle auf der Plasmamembran der DC vorhanden sind, so dass bislang zu geringe Zellzahlen für die Analysen verwendet wurden. Da DC Tumore sehr selten vorkommen ist bis heute leider keine DC-Zelllinie erhältlich, anhand der auch Studien mit größeren Zellzahlen möglich wären. Verfügbare DC-ähnliche Zelllinien spiegeln die Charakteristika einer

DC nur unvollständig wider und sind darüber hinaus nicht in großen Mengen und kostengünstig kultivierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien getestet, von denen lediglich die humane Zelllinie Mutz-3 und die murine Zelllinie DC2.4 Parallelen zu den primären DC aufweisen (Daten nicht gezeigt). Die Kultivierung dieser Zellen war jedoch sehr aufwendig und zeitintensiv, so dass sie den primären DC gegenüber keinen Vorteil boten. Des Weiteren benötigten die Kulturmedien eine Reihe von Zusätzen bzw. konditioniertem Medium von anderen Zelllinien, die sich auf die Supprimierbarkeit auswirken können. Raw264.7 sind prinzipiell eher eine Makrophagen-ähnliche Zelllinie und aufgrund ihres adhären Phänotyps von primären DC zu unterscheiden. Da aus vorangegangenen Studien unserer Gruppe bekannt war, dass die TLR-induzierte Aktivierung durch AnxA1 supprimierbar war und sie in großen Mengen einfach zu kultivieren waren, wurden sie als bestmöglichstes Modellsystem zur Rezeptoridentifikation ausgewählt.

5.1.2 Optimierung der Expression von AnxA1-Mutanten mit pBpa-Inkorporation

Eine mögliche Ursache für die bis zu dieser Arbeit nicht erfolgreiche Identifikation eines AnxA1-Rezeptors könnte eine geringe Bindungsaffinität oder die Instabilität des Rezeptor/AnxA1-Komplexes unter bestimmten Bedingungen sein. Sofern der Rezeptor nur schwach an AnxA1 bindet, kann diese Bindung während der Aufreinigung des Komplexes gelöst werden, so dass der Rezeptor in der anschließenden MS-Analyse nicht nachweisbar ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Felix Wieland (BZH Heidelberg) entstand deshalb der methodische Ansatz, die AnxA1-Rezeptor-Interaktion durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu stabilisieren. Zunächst wurden verschiedene AS für den Einbau der photoreaktiven AS pBpa in das murine AnxA1 ausgewählt (Tab. 4.2) und die Proteinexpression analysiert (Abb. 4.2a-j). Die Expression der pBpa-Mutanten erwies sich als schwierig, weshalb verschiedene Optimierungsansätze angewandt wurden. Dazu gehörte die Veränderung der Expressionstemperatur und –dauer, die Verwendung verschiedener Bakterienstämme, sowie die Variation der Proteininduktion und pBpa-Zugabe, die Erhöhung des pH-Werts und die Verringerung der pBpa-Konzentration. Dennoch konnte nur ein Drittel aller klonierten Mutanten trotz dieser Optimierungsansätze exprimiert werden (Abb. 4.1k). Ursächlich dafür könnte die Größe des pBpa sein, welches mit seinem Benzoyl-Phenylalanin viel Raum einnimmt, und dass der Einbau teilweise an Positionen räumlich kleinerer Aminosäuren erfolgte. Diese sterische Hinderung kann zu Faltungsproblemen führen, so dass das Protein anschließend in den *inclusion bodies* der Membranfraktion abgelagert wird. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die photoreak-

tive Aminosäure para-Azido-Phenylalanin (pAzF) in das AnxA1 eingebaut, um zu überprüfen, ob der Einbau einer kleineren AS zu einer verbesserten Expression führt (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte auch mittels pAzF keine weitere Mutante exprimiert werden, was darauf hindeutet, dass die sterische Hinderung womöglich eine untergeordnete Rolle spielt. Des Weiteren setzt die Verwendung von pAzF eine UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm anstatt der 350 nm beim pBpa voraus. Diese deutlich höher-energetische UV-Strahlung sollte aufgrund einer erhöhten Apoptoseinduktion in den Zellen ebenfalls vermieden werden. Eine verstärkte Apoptoseinduktion kann vermehrt letztlich auch zu nekrotischen Zellen führen. Diese würden intrazelluläre Proteine freisetzen, die ebenfalls mit pBpa kreuzvernetzt werden und somit falsch positive Interaktionen verursachen können.

Letztendlich können auch die Ladungen der substituierten AS eine Rolle für die Expressionseffizienz spielen. Optimal wäre ein Austausch einer ebenfalls hydrophoben/neutralen AS, um ladungsbedingte Wechselwirkungen nicht zu beeinflussen. Leider war dies jedoch nicht möglich, so dass die pBpa-Inkorporation auch an polaren AS wie Glycin und Serin oder an sauren AS wie Glutaminsäure erfolgte. Offensichtlich lässt sich somit aufgrund der Ladung der substituierten AS keine Vorhersage über die Exprimierbarkeit treffen.

Ein weiterer kritischer Punkt in diesem System war die Expressionseffizienz, und die damit verbundenen geringen Ausbeuten der Proteinexpression. Die Inkorporation von pBpa in Proteine, nicht in Peptide, wurde erstmalig 2002 von der Gruppe von P. G. Schultz beschrieben¹⁶⁴. Um höhere Ausbeuten zu erzielen, ist beispielsweise die Verwendung anderer Expressionsvektoren möglich. Prinzipiell ist der in dieser Arbeit verwendete Promotor des pET-Systems (lacUV5-Promotor) einer der stärksten, weswegen eine Steigerung der Expression auch mit anderen Expressionssystemen nicht zu erwarten wäre.

Eine weitere Strategie zur Optimierung der pBpa-AnxA1-Expression bestünde in der Co-Expression von Chaperonen. Diese Chaperone erhöhen im Allgemeinen die Expressionseffizienz, in dem sie eine korrekte Faltung der Proteine fördern, was letztendlich auch zu einer verbesserten Ausbeute der Expression führt^{184,185}. Dieses System hätte jedoch für jede einzelne Mutante in der Zusammensetzung der Chaperone optimiert werden müssen. Darüber hinaus besitzen viele der Chaperon-Expressionssets die gleiche Antibiotikaresistenz wie die des pE-VOL Vektors für das orthogonale tRNA/tRNA Synthetase-Paar und wären somit nicht anwendbar gewesen. Eine zusätzliche Alternative wäre das Anhängen eines Solubilitätsfaktors (z. B. MBL oder GST) an das AnxA1 gewesen, um die Einlagerung in *inclusion bodies* zu verhindern.

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass nicht kalkuliert werden kann, ob der *Tag* selbst auch einen Effekt auf die Proteinexpression oder die spätere Funktion des Proteins besitzt.

Um die Integrität des AnxA1 möglichst zu wahren, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ansatz gewählt, präferentiell strukturell ähnliche AS zu substituieren. Grundsätzlich kann jedoch vorab keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob sich eine bestimmte photoreaktive Aminosäure erfolgreich in ein spezielles Protein einbauen lässt und die Expressionseffizienz dabei unverändert bleibt. Insofern stellen die sieben pBpa-AnxA1-Mutanten erfolgreich exprimierten und aufgereinigten pBpa-AnxA1-Varianten eine gute Ausbeute (Abb. 4.2k) dar. Darüber hinaus ist zu hervorzuheben, dass die pBpa-Inkorporation zu keinem Verlust der immunsuppressiven Funktion führt (Abb. 4.2l). Des Weiteren sind die sieben mutierten AS der einzelnen pBpa-AnxA1-Varianten über das ganze AnxA1-Molekül verteilt, wodurch die Wahrscheinlichkeit sehr hoch war, ein Areal kreuzvernetzen, das einen putativen AnxA1-Rezeptor gebunden hat.

5.1.3 Kritische Parameter der UV-Kreuzvernetzung zur Identifikation eines AnxA1-Rezeptors

Nachdem sieben pBpa-AnxA1 Varianten erfolgreich aufgereinigt werden konnten, sollte als nächstes der experimentelle Aufbau der IP für die MS-Analyse optimiert werden. Bislang wurde die Inkorporation photoreaktiver AS und deren UV-Kreuzvernetzung vor allem für *in vitro* Interaktionsstudien genutzt, bei denen Proteine ohne zellulären Kontext miteinander inkubiert wurden¹⁸⁶. Einige Zeit später wurde diese Methode auf zellbasierte *in vitro* Studien erweitert, in denen intrazelluläre Proteine miteinander kreuzvernetzt wurden¹⁸⁷. Dabei wurden Zellen mit den modifizierten Expressionsvektoren für die zu untersuchenden Proteine und mit dem Vektor für das orthogonale tRNA/tRNA-Synthetase Paar transfiziert. Die photoreaktive AS wird anschließend dem Zellkulturmedium zugesetzt, von der Zelle aufgenommen und in das modifizierte Zielprotein eingebaut. Durch anschließende Bestrahlung können somit intrazelluläre Interaktionen endogener Proteine in der Zelle stabilisiert werden. Dieser Ansatz kam jedoch für die Zielsetzung dieser Arbeit nicht in Frage, da die Studien unserer Gruppe auf der exogenen Zugabe von rekombinantem AnxA1, bzw. der Interaktion eines putativen Rezeptors auf der Oberfläche der DC mit AnxA1 auf der apoptotischen Zelle beruhen⁸³. In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig die Strategie verfolgt, einen rekombinanten, pBpa-modifizierten Liganden mit Zellen zu inkubieren, die den putativen Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen. Durch dieses Vorgehen soll die Bindung von AnxA1 an seinen Rezeptor im Extrazellulärraum nachgestellt werden. Zur

Stabilisierung der Bindung wurden die Zellen im Anschluss bestrahlt, wodurch eine kovalente Bindung ausgebildet wurde. Bedingt durch die Inkubation auf Eis, wird der Komplex nicht internalisiert und in diesem Zustand durch die Bestrahlung stabilisiert. Es gibt jedoch zwei nicht kontrollierbare Szenarien im Verlauf dieser Bestrahlung. Das erste Szenario besteht in der Schädigung der Zellmembran und deren daraus resultierender Durchlässigkeit für intrazelluläre Proteine. Wie die durchflusszytometrischen Analysen der Zellviabilität gezeigt haben (Abb. 4.3a), nimmt die Membranintegrität selbst während der gewählten 20 Minuten Bestrahlung deutlich ab, und es ist davon auszugehen, dass intrazelluläre Proteine freigesetzt werden können. Da AnxA1 auch diverse intrazelluläre Proteine binden kann¹⁸⁸, können so womöglich auch Interaktionen mit beispielsweise Proteinen des Zytoskeletts stabilisiert werden, die als falsch-positive Interaktionspartner in der MS-Analyse detektiert werden. Falsch-positive Proteine können in diesem Fall aber auch prinzipiell die Validität der Methode bestätigen, wenn die identifizierten Interaktionspartner bereits beschrieben sind intrazelluläres AnxA1 zu binden. Durch die nachfolgende Selektion von Proteinen mit Transmembrandomäne oder Rezeptorassoziation können diese falsch-positiven Interaktionspartner wieder verworfen werden. Auf der anderen Seite können aber auch Proteine nur aufgrund der räumlichen Nähe an AnxA1 kreuzvernetzt werden. Kürzere Bestrahlungsdauern führen eventuell zu einer unvollständigen Kreuzvernetzung und wurden vermieden. Daher wurde hier der Kompromiss eingegangen, durch eine etwas längere Bestrahlung auch intrazelluläre Proteine zu vernetzen. Da die Bindung des pBpa-AnxA1 selbst jedoch auf Eis und im hohen Konzentrationen stattfand, ist davon auszugehen, dass ausreichende Mengen des AnxA1 einen Membranständigen Rezeptor binden können hat nicht viele AnxA1 Moleküle frei in Lösung verbleiben, die zu späteren Bestrahlungszeiten noch intrazelluläre Proteine binden können.

Das zweite Szenario beschreibt die Kreuzvernetzung von pBpa-AnxA1-Molekülen untereinander wodurch multimere pBpa-AnxA1-Komplexe entstehen können. Je nach Lage der kovalenten Bindung können sie als Multimer entweder schlechter oder sogar besser an einen putativen Rezeptor binden. Da bereits bekannt ist, dass auch andere Annexine in multimerer Form vorliegen können¹⁸⁹⁻¹⁹¹, spiegelt diese Komplexformung womöglich eher den physiologischen Zustand der Interaktion wieder und stellt einen Vorteil für die Bindung dar. In den initialen IPs zur Überprüfung des Auftretens höhermolekularer Verbindungen wurde auf Höhe von ungefähr 100-120 kDa stets eine zusätzliche Bande mit dem anti-FLAG Nachweis detektiert (Abb. 4.3b). Diese kann entweder auf dem AnxA1-Rezeptor-Komplex, dem trimeren pBpa-AnxA1 oder einem an ein Fragment des Rezeptors gebundenen pBpa-AnxA1 basieren. Mit einem direkt gegen AnxA1-gerichteten Antikörper ließ sich diese höhermolekulare Bande jedoch nicht nachweisen (Daten

nicht gezeigt). Die Ursache dafür liegt möglicherweise darin, dass das entsprechende AnxA1-Epitop für den Antikörper in diesem Komplex, der entweder aus einem AnxA1-Multimer oder AnxA1-Rezeptor-Komplex besteht, nicht mehr zugänglich ist. Dieses Ergebnis beweist, dass infolge der Bestrahlung bei Verwendung der pBpa-AnxA1-Mutanten höhermolekulare Komplexe entstehen, die bei einer IP mit WT AnxA1 nicht nachweisbar sind (Abb. 4.3b) und somit von großem Interesse für die weitere Analyse waren.

5.1.4 Identifikation von LRP1 als neuen AnxA1-Rezeptor

Im Anschluss an die Optimierung der UV-Kreuzvernetzungs-IP wurden insgesamt drei pBpa-AnxA1-Varianten (E54, E55 & E58) für eine IP mit Raw264.7 verwendet und massenspektrometrisch analysiert. Aus den Daten der MS-Analyse ging LRP1 als einziges membranständiges Protein als potentieller AnxA1-Rezeptor hervor (Tabelle 4.3). Zu betonen ist hierbei, dass LRP1 bei Verwendung von drei verschiedenen pBpa-AnxA1-Mutanten jeweils als potentieller Rezeptor aus der MS-Analyse hervorging und nicht in der Kontrolle nachgewiesen wurde. Die Peptide des LRP1 befanden sich exklusiv in den zwei oberen Fragmenten der Gelspur des SDS-Gels, in denen LRP1 aufgrund des hohen Molekulargewichts (~ 600 kDa) auch zu erwarten ist (Abb. 4.3c). Bei den identifizierten Peptiden handelt es ausschließlich um Fragmente der extrazellulären α -Kette, die auch im physiologischen Kontext der Efferozytose in der Lage wäre, exogenes AnxA1 zu binden. Die verschiedenen Peptide befinden sich sowohl innerhalb der vier beschriebenen Bindungsdomänen des LRP1 als auch in den EGF-*Repeats*. Dies könnte darauf hindeuten, dass mehrere der vier Ligandenbindungsdomänen im LRP1-Molekül AnxA1 binden können. Auf der anderen Seite ist es aber auch möglich, dass es nur eine oder wenige Bindungsstellen gibt und dass große, von AnxA1-präzipitierte Fragmente im Rahmen der MS-Analyse weiter gespalten wurden. Die Abwesenheit jeglicher Peptide der LRP1 β -Kette belegt die Spezifität der Interaktion und bietet Grund zur Annahme, dass die unspezifische Vernetzung mit intrazellulären Proteinen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Ein interessanter Aspekt im Rahmen der Kreuzvernetzungsstudien ist die unterschiedliche Co-IP-Effizienz der verschiedenen Mutanten. Wiederholt wurde mit der AnxA1-Mutante E315 die schwächste Interaktion mit LRP1 nachgewiesen. Diese Aminosäure befindet sich auf der Seite, mit der das AnxA1 der Membran der apoptotischen Zelle und somit nicht dem putativen Rezeptor zugewandt ist. Somit besitzt das pBpa an dieser Position aus sterischen Gründen wahrscheinlich keinen Zugang zum Rezeptor. Dass dennoch eine Interaktion mit LRP1 nachgewie-

sen werden kann, könnte wiederum auf einer Art multimerem AnxA1-Komplex beruhen, der grundsätzlich für LRP1 affiner ist.

5.1.5 LRP1 bindet auch an WT AnxA1 nach UV-Bestrahlung von Raw264.7 und primären Makrophagen

Überraschend ist, dass auch WT-AnxA1 infolge von UV-Bestrahlung verstärkt mit LRP1 interagiert (Abb. 4.5a-c). Dies deutet auf einen generellen Effekt der UV-Bestrahlung auf Zellen beziehungsweise AnxA1 hin. Möglicherweise entstehen durch die Bestrahlung auch beim WT-AnxA1 Radikale, die oligomerisieren und anschließend in der Lage sind, effektiver an LRP1 zu binden. Die Bestrahlung könnte auch generell eine Konformationsänderung im LRP1 induzieren, die zur verbesserten AnxA1 Bindung führt. Allerdings erfolgt ohne Zugabe von AnxA1 oder auch ohne anti-FLAG Antikörper kein LRP1 Nachweis, so dass zumindest eine unspezifische LRP1-IP infolge der Bestrahlung der Zellen auszuschließen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer neuen Variante der UV-Kreuzvernetzung somit erstmalig die Interaktion von AnxA1 mit LRP1 beschrieben und deren Spezifität in weiteren Studien validiert und charakterisiert.

5.2 LRP1 bindet Calcium-abhängig verschiedene Annexine mit hoher Affinität

Im Anschluss an die Validierung des LRP1-AnxA1-Komplexes mittels Co-IP sollten weitere Bindungsstudien angeschlossen werden um die Spezifität und Affinität der Interaktion zu charakterisieren und auszuschließen, dass der FLAG-Tag des AnxA1 eine Rolle bei der Bindung spielt. Die eigens dafür entwickelten Bindungsexperimente auf ELISA-Basis belegten eindeutig, dass die Interaktion unabhängig vom FLAG-Tag des AnxA1 erfolgt und humanes LRP1 in diesen Bindungsstudien sowohl humanes als auch murines AnxA1 bindet (Abb. 4.6a-d). Aufgrund der Erkenntnisse unserer Gruppe, dass Annexine redundant im Bezug auf die immunsuppressive Funktion wirken, sollte des Weiteren überprüft werden, ob LRP1 womöglich auch andere Annexine binden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Liganden Blot durchgeführt, der deutlich zeigte, dass LRP1 nicht nur an murines AnxA1, sondern auch an murines AnxA5 und AnxA13 sowie die humane und murine Kerndomäne bindet (Abb. 4.7a-c). Dies deckt sich mit

den Ergebnissen unserer Gruppe, dass Annexine prinzipiell eine redundante Funktion ausüben können (Promotionsarbeit B. Linke, 2011).

Ursprünglich wurde spekuliert, dass die Bindungsaffinität von AnxA1 an seinen Rezeptor eventuell sehr gering ist und die Bindung deswegen mittels der Inkorporation einer photoreaktiven AS und anschließender UV-Kreuzvernetzung verstärkt werden muss. Nachdem nun die Interaktion von AnxA1 und LRP1 in verschiedenen, qualitativen Studien bestätigt werden konnte, sollten Affinitätsmessungen folgen, die die Bindungsstärke genauer beziffern, um einzuschätzen zu können, ob es sich um die erwartete schwache Bindungsaffinität handelt. Hierfür wurden *Quartz Crystal Microbalance*-Studien durchgeführt, bei denen humanes LRP1 auf einem Chip immobilisiert wurde (Abb. 4.8a) und die Affinitäten der Bindung verschiedener Annexine gemessen wurden (Abb. 4.8b-k). Im physiologischen Kontext der Apoptose translozieren verschiedene Annexine an die Oberfläche von apoptotischen Zellen (Promotionsarbeit B. Linke, 2011), wodurch eine Konformationsänderung des Annexins erfolgt^{83,89}. Aufgrund des im Extrazellulärraum physiologisch vorhandenen Calciums (1-2 mM) sollte deswegen zusätzlich die Calciumabhängigkeit der Bindung von AnxA1 an LRP1 analysiert werden. Auch für LRP1 wurde die calciumabhängige Bindung an einige Liganden beschrieben¹⁴³. Die Ergebnisse der Messungen in Anwesenheit von Calcium widerlegten klar die Annahme von schwachen Bindungsaffinitäten, da diese im nanomolaren Bereich liegen (Tab. 4.4). Die höchsten Affinitäten wiesen sowohl die humane Kerndomäne als auch das humane und murine AnxA1 auf, die alle eine K_D von unter 100 nM besitzen. Die fast identischen Bindungsaffinitäten zwischen der murinen und humanen Form sind mit der 90%-igen Homologie der beiden Annexine erklärbar. Die stärkste Bindung wurde bei der Interaktion mit der Kerndomäne nachgewiesen. Dies unterstreicht die redundante Bindung verschiedener Annexine an LRP1 unabhängig vom N-Terminus. Auf Basis der K_D -Werte erscheint die murine Kerndomäne mit zehnfach geringerer Affinität (230 nM) zu binden als die humane (35 nM). Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass es sich bei den ermittelten K_D -Werten eher um Bereiche von Bindungsaffinitäten handelt, die angeben, in welchen Dimensionen sich die Bindungsstärke bewegt und wie die verschiedenen Annexine in Relation zueinander binden. Die murinen AnxA5 und AnxA13 binden weniger affin als AnxA1, die murine Kerndomäne weniger affin als die humane. Im Vergleich zu den Werten in Calciumabwesenheit wird deutlich, dass die Interaktion zwischen LRP1 und allen Annexinen stark Calcium-abhängig ist. Dieser Effekt ist bei AnxA13 am wenigsten ausgeprägt. In allen anderen Fällen ist mindestens eine Verzehnfachung des K_D -Wertes zu beobachten. Die sehr niedrigen χ^2 -Werte sprechen außerdem dafür, dass das gewählte *1:1 two state model* gut gewählt ist, um die AnxA1-LRP1-Interaktion zu analysieren.

Im direkten Vergleich mit den Bindungskurven der Negativkontrolle PRMT6 deuten die Ergebnisse der Calcium-freien Messungen jedoch immer noch auf eine schwache Bindung hin. Dies spiegelt sich unter anderem in dem deutlich höheren K_D -Wert (332 μM) und insbesondere in der Dissoziationskonstanten (k_d) des PRMT6 wieder. Um die Stärke der AnxA1-LRP1-Interaktion besser einordnen zu können, kann sie mittels einiger Beispiele mit schwachen oder starken Bindungen verglichen werden. Die in der Regel stärksten Bindungen werden mit affinitätsgereinigten oder monoklonalen Antikörpern oder Zytokinen und deren Rezeptoren erreicht. Beispielsweise bindet RAP an LRP1 mit einer Affinität von 1 nM¹⁹², TNF- α den TNF-Rezeptor 1 mit einer Affinität von 19 pM¹⁹³, und hoch affine Antikörper besitzen K_D -Werte bis in den fM-Bereich¹⁹⁴. Mit dem AnxA1-LRP1-Komplex vergleichbare Affinitäten weist die Interaktion von TRAIL mit dem TRAIL-Rezeptor 1 ($K_D \sim 70$ nM) auf, wohingegen der Leukozytenrezeptor CD200RLa seinen Liganden CD200 mit einer sehr niedrigen Affinität von 500 μM bindet¹⁹⁵. Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass die Bindungsaffinität von AnxA1 an LRP1 im Rahmen von durchaus als affin beschriebenen Rezeptor-Ligand-Interaktionen liegt.

Von besonderem Interesse ist der Vergleich der Bindungsaffinitäten zu den beschriebenen AnxA1-Rezeptoren, den FPRs. Da in diesem Kontext der N-Terminus von AnxA1 als Bindungsdomäne beschrieben wurde, beziehen sich viele Studien auf die Affinitäten des N-Terminus¹¹⁶. Die Bindungsaffinität von humanem, endogenem, vollständigen AnxA1 an den humanen FPR wird mit 0,9 μM angegeben¹¹⁶, was im Vergleich zu der Bindung an LRP1 eine bis zu Faktor 22 schwächere Bindung darstellt. Somit wurde mit LRP1 ein AnxA1-Rezeptor identifiziert, an den AnxA1, sowie AnxA5, AnxA13 und die Kerndomäne mit höherer Affinität binden, als die bislang beschriebenen AnxA1-Rezeptoren der FPR-Familie.

Stöchiometrie des AnxA1-LRP1-Komplexes

Aufgrund der Tatsache, dass die analysierten Annexine mit deutlich höherer Affinität als zuvor angenommen an LRP1 binden, stellt sich die Frage, warum diese Interaktion erst mittels UV-Kreuzvernetzung identifiziert werden konnte. Deswegen ist es sinnvoll, sich die Stöchiometrie dieser Interaktion genauer anzuschauen. Mittels der an den ATTANA-Chip gekoppelten Menge LRP1 und den damit gemessenen K_D Werten lässt sich berechnen, wie viele Annexin-Moleküle an wie viele Moleküle LRP1 gebunden haben um das Equilibrium zu erreichen.

Ausgehend vom ersten ATTANA-Chip befanden sich max. 1 μg gekoppeltes LRP1 (600 kDa) und somit ca. 1×10^{12} LRP1 Moleküle (1,7 pmol) auf dem Chip. Die 1 μg basieren auf der injizier-

ten Menge LRP1, von der man jedoch nicht eins zu eins auf die finale Menge gekoppeltes LRP1 schließen kann, und geben somit lediglich einen ungefähren Wert an. Aufgrund der molekularen Größe von LRP1 (~600 kDa) ist anzunehmen, dass nicht sehr viele Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle exponiert werden können. Für 1×10^{12} LRP1-Moleküle würde daher eine große Zellzahl benötigt werden. Zusammen mit der Annahme, dass nicht jedes LRP1-Molekül von AnxA1 im Rahmen einer IP gebunden wird, könnte dies eine der Ursachen der schwierigen Identifikation der Interaktion sein. Berechnet man nun beispielsweise anhand der K_D Werte von murinem oder humanem AnxA1 (~ 95 nM) die Menge gebundener AnxA1 Moleküle im Equilibrium, ergibt sich ein Wert von ca. 6×10^{12} AnxA1-Molekülen (~ 10 pmol), die an die gekoppelten 1×10^{12} LRP1-Moleküle binden. Dies erscheint durchaus realistisch, da vermutlich viele Annexin-Moleküle in unmittelbarer Nähe auf einer apoptotischen Zelle exponiert werden können. Die Zahlen deuten an, dass vermutlich mehrere Moleküle AnxA1 an die lange α -Kette des LRP1 binden und dadurch bei einer IP, selbst mit großen Mengen AnxA1, verhältnismäßig wenig LRP1 präzipitiert wird.

Die stöchiometrischen Berechnungen stellen einen Näherungswert der molekularen Verhältnisse der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 dar. Wie bereits erwähnt, kann die exakte, an den Chip gekoppelte Menge LRP1 nicht gemessen werden. Vermutlich sind sogar weniger als 1×10^{12} Moleküle an den Chip gekoppelt, was bedeuten würde, dass im Verhältnis noch mehr als sechs Moleküle AnxA1 an ein Molekül LRP1 binden können. Dadurch kann es zu sogenannten Aviditätseffekten kommen. Aviditätseffekte beschreiben den Zustand, wenn an einem monovalenten Molekül, mehrere Bindungsstellen für den Interaktionspartner existieren. Dadurch ist es theoretisch möglich, dass der Interaktionspartner von einer Bindungsstelle des Moleküls dissoziiert und an dem exakt gleichen Molekül an einer anderen Stelle erneut bindet. Dies erscheint aufgrund der Größe des LRP1 und den vielen Bindungsdomänen als ein naheliegendes Modell der Interaktion. Daraus folgt, dass für die berechneten Affinitäten der Interaktion von AnxA1 mit LRP1 von apparenten Bindungsaffinitäten K_m gesprochen werden sollte, die die erläuterten Aviditätseffekte berücksichtigen.

5.3 Die AnxA1-vermittelte Immunsuppression in Makrophagen und DC erfolgt LRP1-unabhängig

AnxA1 supprimiert die TLR-induzierte Aktivierung in Makrophagen

Studien unserer Gruppe konnten zeigen, dass AnxA1 die TLR-induzierte Aktivierung von DC supprimiert, und Ziel dieser Arbeit war es, den dafür relevanten AnxA1-Rezeptor auf DC zu identifizieren⁸³. Wie in Kapitel 5.1 bereits erläutert wurde, war diese Identifikation bislang vor allem nicht möglich, da keine DC-ähnliche Zelllinie verfügbar ist. Aufgrund der Information, dass AnxA1 auch in Raw264.7 immunsuppressiv wirkt (Promotionsarbeit A. Mahr, 2010), wurde diese murine, Makrophagen-ähnliche Zelllinie für die Interaktionsstudien zur Identifizierung des LRP1-AnxA1-Komplex verwendet. Da Makrophagen genau wie DC durch TLR-Stimuli aktiviert werden können, sollte überprüft werden, ob das Phänomen der AnxA1-vermittelten Immunsuppression auch in primären, murinen Makrophagen reproduzierbar ist. Darüber hinaus existierten zu dem damaligen Zeitpunkt lediglich Makrophagen-spezifische LRP1 KO-Mäuse, die für die weiteren Analysen der Supprimierbarkeit durch exogenes AnxA1 verwendet werden konnten. Mittels eines klassischen Suppressionsexperimentes konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die TLR-induzierte pro-inflammatorische Antwort nicht nur in DC, sondern auch in Makrophagen durch rekombinantes AnxA1 supprimiert werden kann (Abb. 4.9a). Genau wie in DC erfolgt dies bereits auf dem Niveau der reduzierten IL-12 mRNA-Expression (Abb. 4.9b). Dies deutet womöglich auf den gleichen Signalweg und auf einen identischen Rezeptor für beide Zelltypen hin. Die geringe Restmenge IL-12 sowohl auf mRNA-Ebene als auch im Überstand zeigt, dass AnxA1 den TLR-Stimulus in der angewandten Konzentration nicht vollständig unterdrücken kann. Möglicherweise würde sich die IL-12 Induktion jedoch durch die Stimulation mit geringeren CpG-Konzentrationen vollständig supprimieren lassen. Studien anderer Gruppen analysierten bislang lediglich den Einfluss von endogenem AnxA1 im Bezug auf die TLR-induzierte Aktivierung¹⁹⁶. Die entscheidende Frage war somit, ob die AnxA1-vermittelte Immunsuppression in Makrophagen LRP1-abhängig ist. Dies konnte mittels aus Knochenmark differenzierten Makrophagen aus der Makrophagen-spezifischen LRP1-KO Maus im klassischen Suppressionsexperiment beantwortet werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die AnxA1-vermittelte Immunsuppression in Makrophagen LRP1-unabhängig erfolgt (Abb. 4.9d&e). Um zusätzlich die Frage nach der AnxA1-induzierten Immunsuppression in DC beantworten zu können, wurde die bis *dato* nicht existierende DC-spezifische LRP1 KO-Maus generiert (Abb. 4.10a). Mit aus Knochenmark differenzierten DC dieser Mäuse wurden Suppressionsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse zeigten, dass diese DC nach wie vor durch apoptotische Jur-

kat T-Zellen (Abb. 4.10b) oder AnxA1 (Abb. 4.10c&d) supprimierbar sind und der AnxA1-Effekt somit weder in Makrophagen noch in DC LRP1-abhängig ist.

Bislang beschreiben zwei weitere Veröffentlichungen LRP1 in einem direkt pro- beziehungsweise anti-inflammatorischen Kontext. Diese können jedoch nicht mit der direkten Bindung von AnxA1 an LRP1 in Verbindung gebracht werden. Zurhove *et al.* zeigen, dass in Raw264.7 die intrazelluläre LRP1 Domäne (IZD) einen negativen Rückkopplungsweg zur Beendigung der LPS-induzierten inflammatorischen Antwort auslöst¹⁴⁵. Somit vermittelt LRP1 zwar einen anti-inflammatorischen Effekt, jedoch wird die Abspaltung der LRP1-IZD nicht durch Ligandenbindung an LRP1 ausgelöst, sondern durch einen negativen Rückkopplungsweg infolge des pro-inflammatorischen Stimulus. In diesem Szenario würde die direkte Bindung von AnxA1, welches an den extrazellulären Teil des LRP1 bindet, keine Rolle spielen, da der TLR-Stimulus zeitlich vorausgeht. Dennoch wurde auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die IZD eventuell infolge von CpG-Stimulation in den Nukleus transloziert und der Effekt durch AnxA1 verstärkt werden kann. Allerdings war nach CpG-Stimulation bereits die IZD selbst nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Studie von Gorovoy und Kollegen analysierte die Abspaltung von Fragmenten der α -Kette¹⁶². Diese lösliche Form von LRP1 (*soluble LRP1*, sLRP1) wurde vermehrt in den Seren von Patienten nachgewiesen, die an einer Autoimmunerkrankung wie SLE oder RA leiden. Des Weiteren zeigten Gorovoy *et al.*, dass sLRP1 ein potenter Stimulus des pro-inflammatorischen NF- κ B Signalwegs ist. Sofern AnxA1 in diesem Zusammenhang eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt, müsste es somit durch die Bindung an die extrazelluläre LRP1-Domäne die Metalloproteinase-induzierte Spaltung von LRP1 in sLRP1 verhindern. Die naheliegendste Erklärung dafür wäre die Blockierung der Proteinaseschnittstelle im LRP1 durch AnxA1. Als Voraussetzung für die Analyse der Funktion von AnxA1 in diesem Prozess müsste sLRP1 infolge von der in unserer Gruppe standardmäßig verwendeten CpG-Stimulation im Überstand von Zellen nachweisbar sein. Trotz Titration der CpG-Konzentration und verschiedenen Kinetiken war es jedoch nicht möglich, sLRP1 im Überstand nachzuweisen, so dass der AnxA1-Effekt folglich nicht analysiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Zu erwähnen ist, dass in allen genannten, so wie den eigenen Studien nur die Zytokinkonzentrationen im Zellüberstand und somit Signal 3 für die T-Zellaktivierung analysiert wurde. Der Einfluss auf Signal 1 und 2, Antigenpräsentation sowie Regulation co-stimulatorischer Moleküle wurde bislang noch nicht analysiert. Insofern könnten Studien zur Analyse dieser Signale ange-

geschlossen werden, um zu klären, ob der LRP1-AnxA1-Komplex möglicherweise selektiv nur eines der Signale beeinflusst.

Zusammengefasst konnten im Einklang mit der vorliegenden Arbeit bislang keine pro- oder anti-inflammatorischen Antworten nach direkter Ligandenbindung an LRP1 beschrieben werden. Erstmals wurde jedoch gezeigt, dass exogenes, rekombinantes AnxA1 die TLR-induzierte Aktivierung von Makrophagen supprimieren kann.

5.4 Die Efferozytose in professionellen und nicht-professionellen Phagozyten erfolgt AnxA1- und LRP1-unabhängig

Die Beseitigung von apoptotischen Zellen ist ein effizienter und essentieller Prozess, um den Gleichgewichtszustand eines Organismus zu erhalten. Sowohl unsere als auch andere Gruppen beschrieben Efferozytose durch professionelle Phagozyten als einen generell anti-inflammatorischen Vorgang, der zur APC-vermittelten Toleranzinduktion *in vivo* führt^{16,43,83,197-200}. LRP1 wurde bereits frühzeitig aufgrund seiner großen Ligandendiversität und seiner endozytotischen Funktion mit der Aufnahme von apoptotischen Zellen in Verbindung gebracht^{143,149}. Diese Studien basieren in der Regel auf der Interaktion von LRP1 auf Makrophagen mit Calreticulin (CRT) auf der apoptotischen Zelle, bei der der Komplementfaktor C1q als Brückenmolekül fungiert^{39,201}. Die direkte Interaktion dieser drei Proteine wird jedoch nur unzureichend nachgewiesen und wird auch in anderen Studien angezweifelt²⁰². Des Weiteren ist an dieser Stelle zu betonen, dass die Rolle von LRP1 in vielen Studien lediglich unter Verwendung blockierender Agenzien oder antagonistischer Antikörper analysiert wurde, da die LRP1 KO-Maus embryonal lethal ist und erst seit wenigen Jahren gewebsspezifische LRP1 KO-Mäuse existieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Efferozytose in Abhängigkeit der AnxA1-LRP1-Interaktion sowohl in professionellen (DC & Makrophagen) als auch nicht-professionellen Phagozyten (MEF) analysiert. In den professionellen Phagozyten zeigte sich prinzipiell kein LRP1-Einfluss auf die Efferozytose (Abb. 4.11b&c). In Makrophagen war eine leichte Erhöhung der Efferozytose in Abhängigkeit von zusätzlichem AnxA1 auf den apoptotischen Zellen sichtbar, jedoch war dies auch in LRP1-defizienten Makrophagen zu beobachten. In Bezug auf die Efferozytose in DC konnte keine LRP1-AnxA1-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Eine naheliegende Ursache dafür ist das große Repertoire an Phagozytoserezeptoren dieser Zellen, die redundant wirken und somit möglicherweise den Verlust von LRP1 kompensieren können. Hinzu kommt, dass auch die apoptotischen Zellen eine Vielzahl von *eat me*-Signalen exponieren, die andere Rezeptoren auf dem Phagozyten binden können^{15,18}. In so einem komplexen System

herrscht somit eine Redundanz sowohl auf Seiten der Liganden als auch seitens der Rezeptoren vor, durch die eine Analyse des Effektes einzelner Faktoren schwer möglich ist. In MEF hingegen konnte zumindest ein prinzipieller LRP1-Einfluss auf die Efferozytose nachgewiesen werden, da hier vermutlich weniger Phagozytoserezeptoren exprimiert werden, die die LRP1-Defizienz ausgleichen könnten. Die LRP1-Defizienz führte zu einer verminderten Efferozytose, die jedoch weder in LRP1 WT- noch in LRP1 KO- Zellen abhängig von AnxA1 war (Abb. 4.11d).

LRP1 wurde sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den Studien von Lillis *et al.*¹⁸¹ sowie Subramaniam¹⁵⁵ *et al.* als Efferozytoserezeptor analysiert. Während in unseren eigenen Studien sowie in der Studie von Subramaniam und Kollegen früh-apoptotische Zellen (AnxAV⁺/PI⁺) mittels UV-C Strahlung generiert wurden, induzierten Lillis *et al.* die Apoptose mittels Etoposid und generierten dadurch spät-apoptotische Zellen (AnxV⁺/PI⁺). Diese verschiedenen Apoptose-Stadien können sich unterschiedlich auf die APC auswirken und entweder eine pro- oder anti-inflammatorische Antwort induzieren^{40,203}. Im Kontext der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich früh-apoptotische Zellen verwendet, für die beschrieben ist, dass sie eine anti-inflammatorische Antwort auslösen²⁰⁴. Lillis *et al.* analysierten unter Verwendung Etoposid-behandelter apoptotischer Jurkat T-Zellen die Efferozytose in LRP WT- oder LRP1 KO-Makrophagen¹⁸¹. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Abb. 4.11b) konnte keine LRP1-Abhängigkeit für die Aufnahme von apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Auch nach zusätzlicher Kopplung von AnxA1 an die apoptotischen Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine Steigerung der Efferozytoserate erreicht werden. Wie bereits erwähnt wurde, gilt es hierbei jedoch zu berücksichtigen, dass sich die eigenen Daten nicht zwingend mit denen der Veröffentlichung von Lillis vergleichen lassen, da die apoptotischen Zellen unterschiedlich generiert wurden und folglich der Apoptosestatus unterschiedlich war.

Insgesamt ist die Analyse einzelner Faktoren, die an der Efferozytose beteiligt sind, nur schwer nachzuweisen, und auch die eigenen Studien konnten hier keine deutlichen Effekte des LRP1-AnxA1-Komplex in professionellen und nicht-professionellen Phagozyten nachweisen.

Die Subpopulation der DC ist entscheidend für Efferozytose- und Kreuzpräsentations-Studien

DC sind eine heterogene Zellpopulation, deren Subpopulationen eine unterschiedliche Effizienz im Hinblick auf Kreuzpräsentation aufweisen¹⁵⁵. Bereits in Kapitel 1.3 dieser Arbeit wurde er-

wähnt, dass die $CD8\alpha^+$ DC-Subpopulation die effizienteren APC sind, um den $CD8^+$ T-Zellen Selbst-Antigene kreuzzupräsentieren. Subramaniam *et al.* analysierten die Efferozytose und Kreuzpräsentation in Abhängigkeit von LRP1 in DC anhand von $CD8\alpha^-$ und $CD8\alpha^+$ DC aus der Milz, wobei $CD8\alpha^+$ DC deutlich mehr LRP1 auf der Oberfläche exprimierten als $CD8\alpha^-$ ¹⁵⁵. Die Daten von Subramaniam *et al.* zeigen, dass $CD8\alpha^+$ Zellen eine wesentlich höhere Efferozytosekapazität und Fähigkeit zur Kreuzpräsentation aufweisen, die abhängig von einem trimeren Komplex aus LRP1, Axl und Ranbp9 ist. *In vitro* und *in vivo* konnten sie einen signifikanten Unterschied in der Efferozytose detektieren, wenn LRP1 mittels Antikörper oder RAP blockiert wurde oder sie LRP1-defiziente DC verwendeten. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass LRP1 während der Efferozytose spezifisch für die Internalisierung der apoptotischen Zelle eine Rolle spielt, aber nicht für die vorausgehende Bindung der apoptotischen Zelle an den Phagozyten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DC mittels GM-CSF aus Knochenmarksvorläuferzellen generiert und exprimieren nahezu kein $CD8\alpha$ (Daten nicht gezeigt). Dadurch stellt sich die Frage, ob diese DC prinzipiell das richtige System sind, um Efferozytose und Kreuzpräsentation zu analysieren. Mit diesen $CD8\alpha^-$ DC konnten weder wesentliche Unterschiede zwischen LRP1 WT und LRP KO-DC noch eine Abhängigkeit von AnxA1 nachgewiesen werden (Abb. 4.11b). Daraus folgt, dass sich die Efferozytosedaten der vorliegenden Arbeit nicht zwingend mit denen von Subramaniam *et al.* vergleichen lassen.

Subramaniam und Kollegen postulieren einen trimeren Komplex aus Axl, Ranbp9 und LRP1 der direkt die Kreuzpräsentation beeinflussen würde. Genauer betrachtet wird jedoch lediglich nur Efferozytose untersucht und gezeigt, dass infolge negativ beeinflusster Efferozytose auch die Kreuzpräsentation negativ reguliert ist. Die Kreuzpräsentation direkt und unabhängig von der Efferozytose wurde nicht untersucht. Die intrazellulären Mechanismen, die zur Kreuzpräsentation führen, werden in der Studie von Subramaniam *et al.* nicht weiter analysiert. Generell weist die gesamte Studie jedoch eine Inkonsistenz in Bezug auf die verwendete DC-Subpopulation auf. Anfangs wird die Relevanz der $CD8\alpha^+$ DC betont, während im späteren Verlauf der Veröffentlichung BMDC und keine DC aus der Milz für Kreuzpräsentationsstudien genutzt werden. Dennoch wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein initiales Experiment durchgeführt, bei dem Beads von $CD8\alpha^+$ DC aus der Milz besser phagozytiert wurden als von $CD8\alpha^-$ DC (Daten nicht gezeigt). Zu bedenken ist hierbei, dass in diesen Experimenten die Phagozytose von Beads und nicht die Efferozytose apoptotischer Zellen analysiert wurde, für die es zu anderen Ergebnissen kommen könnte. Insgesamt ist es überraschend, dass der in der Studie von Subramaniam postulierte LRP1-Komplex einen so großen Effekt auf die Efferozytose ausübt. Ausgehend von der Anzahl der auf DC exprimierten Phagozytoserezeptoren, wie beispielsweise Tim-3

oder CD36, wäre zu erwarten, dass die Blockade von LRP1 von anderen Phagozytoserezeptoren weitestgehend kompensiert werden kann.

In den AnxA1-IPs aus den Raw264.7 und den daraus generierten MS-Daten waren weder Ranbp9 noch Axl nachweisbar. Dies kann jedoch von den generellen IP-Bedingungen abhängen sowie auf der Tatsache basieren, dass hier eine Makrophagen-Monozyten-ähnliche Zelllinie verwendet wurde.

Efferozytose findet in unterschiedlichen Geweben unter der Beteiligung verschiedener Zellen statt. Zu phagozytierende Zellen treten beispielsweise bei der negativen Selektion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus oder in Form von Thymozyten, apoptotischer Erythrozyten oder Darmepithelzellen auf ¹³. Grundsätzlich stellt sich somit die Frage, welches zelluläre System ein möglichst physiologisches Szenario der Efferozytose widerspiegelt und in welchen dieser Szenarien die AnxA1-LRP1-Interaktion relevant sein könnte. Dies hängt letztendlich auch davon ab, welche der Phagozyten LRP1 exprimieren bzw. welche apoptotische Zellen AnxA1 oder andere Annexine exponieren. Für die eigenen Studien, sowie der von Lillis und Subramaniam, wurden apoptotische, humane Jurkat T-Zellen als zu phagozytierende apoptotische Zellen verwendet. Optimal wäre vermutlich die Verwendung apoptotischer, muriner Zellen, auch wenn viele *eat me*-Signale zwischen Mensch und Maus möglicherweise homolog sind. Murine Neutrophile würden sich anbieten, da AnxA1 nahezu 4% des Gesamtproteingehalts von Neutrophilen ausmacht ⁸⁶ und sie in Kultur bereits einen Tag nach Isolation aus der Maus in die Apoptose gehen. Idealerweise könnten dann auch Neutrophile aus der AnxA1 KO-Maus im direkten Vergleich analysiert werden.

5.5 Die Phagozytose von AnxA1-gekoppelten Beads ist LRP1-abhängig

Die beidseitige Redundanz von *eat me*-Signalen und Phagozytoserezeptoren im Rahmen von Studien zur Efferozytose erschwert die Analyse der Relevanz einzelner Faktoren. Um den Effekt dennoch zumindest von Ligandenseite aus isoliert zu untersuchen, wurde AnxA1 an grünfluoreszierende Beads gekoppelt und deren Phagozytose in Abhängigkeit von LRP1 analysiert. Dafür standen wieder sowohl professionelle (Makrophagen & DC) als auch nicht-professionelle Phagozyten (MEF) zur Verfügung. In Makrophagen war die Phagozytose von AnxA1-gekoppelten Beads nahezu identisch (Abb. 4.12b). Dies könnte auf der redundanten Funktion

anderer Phagozytoserezeptoren der Makrophagen basieren. Die fundierte Studie von Lillis und Kollegen konnte ebenfalls zeigen, dass LRP1 bei der Aufnahme apoptotischer Zellen keine Rolle spielt, wohingegen mit dem LRP1-Liganden RAP gekoppelte Beads effizienter von LRP1 WT- als LRP1 KO-Zellen aufgenommen wurden¹⁸¹. Dies konnte mit AnxA1-gekoppelten Beads nicht reproduziert werden, da eventuell weitere Rezeptoren existieren, die AnxA1 binden können. RAP hingegen bindet vermutlich ausschließlich an LRP1.

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch ein Einfluss von LRP1 auf die Phagozytose von AnxA1-gekoppelten Beads in DC und MEFs gezeigt werden (Fig. 4.12c & 4.12d). Sowohl LRP1 WT als auch LRP1 KO-DC waren zwar generell in der Lage, PRMT6- oder AnxA1-Beads zu phagozytieren, jedoch war die Phagozytoserate von AnxA1-Beads in LRP1 KO-DC sichtbar reduziert. Diese Ergebnisse erweitern die Studie von Subramaniam und Kollegen, die ebenfalls die Phagozytose von Beads, jedoch ohne zusätzlich gekoppelten LRP1-Liganden in LRP1 WT- oder LRP1 KO-DC analysiert haben.

Interessanterweise konnte der LRP1-abhängige AnxA1-Effekt auf die Phagozytose noch wesentlich deutlicher in nicht-professionellen Phagozyten (MEF) detektiert werden (Abb. 4.12d). MEF wurden analog zu den DC Studien mit PRMT6- AnxA1- oder CRT-gekoppelten Beads inkubiert mit dem Ergebnis, dass die AnxA1-vermittelte Erhöhung der Phagozytoserate in LRP1 KO-DC deutlich weniger nachweisbar ist. Dies kann eventuell darauf zurückzuführen sein, dass nicht-professionelle Phagozyten womöglich ein reduzierteres Phagozytoserezeptor-Repertoire besitzen und somit der Verlust von LRP1 nicht wie in professionellen Phagozyten kompensiert werden kann. Somit ist es nachvollziehbar, dass die Bedeutung des AnxA1-LRP1-Komplexes in diesen Zellen besser nachweisbar ist.

Zusammengefasst erweitern die gezeigten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Studien von Lillis und Subramaniam um die Aussage, dass AnxA1 die Phagozytoserate insbesondere auf DC und MEF in Abhängigkeit von LRP1 positiv beeinflussen kann.

5.6 Ausblick

Die effiziente Beseitigung von apoptotischen Zellen ist ein essentieller Prozess, der zur Erhaltung der Homöostase eines Organismus und der peripheren Toleranz beiträgt. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass AnxA1 ein für die Immunsuppression relevantes Molekül ist und die TLR-induzierte Aktivierung pro-inflammatorischer Antworten inhibiert⁸³. Diese Immunsuppression kann sowohl durch rekombinantes AnxA1 als auch in Verbindung mit der Efferozytose apoptotischer Zellen erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LRP1 ein Rezeptor für AnxA1 auf APCs ist, jedoch nicht direkt die Immunsuppression vermittelt, sondern zur AnxA1-abhängigen Phagozytose beiträgt. Um den AnxA1-Effekt genauer zu untersuchen, sind weitere Phagozytosestudien nötig, die AnxA1 zwar möglichst isoliert, aber dennoch im physiologischen Kontext analysieren. Neben den bereits erwähnten apoptotischen, murinen neutrophilen Granulozyten oder Splenozyten stellen die in unserer Gruppe etablierten Annexin-exprimierenden (AnxA1, AnxA5, AnxA13) Insektenzellen Schneider S2, ein elegantes Werkzeug dar (Promotionsarbeit B. Linke, 2011). Aufgrund ihrer großen phylogenetischen Entfernung von der Maus exponieren sie mit Ausnahme von PS möglicherweise wenig weitere Signale, die sich redundant auf die Efferozytose auswirken und den Anx-Effekt überlagern würden. Da früh-apoptotische S2-Zellen bedingt durch die exprimierten Annexine immunsuppressiv auf murine DC wirken, sind sie generell in der Lage, DC zu binden und sollten allgemein für Phagozytosestudien geeignet sein.

Ungeachtet der Phagozytosestudien *in vitro* sollten *in vivo* Studien angeschlossen werden, die die Bedeutung der AnxA1-LRP1 Interaktion insbesondere in $CD8\alpha^+$ DC analysieren. Da diese Subpopulation *in vitro* nicht effizient generierbar ist, könnten AnxA1-gekoppelte Beads oder die Anx-exprimierenden S2-Zellen in LRP1 WT- oder LRP1 KO-Mäuse injiziert und deren Phagozytose durch $CD8\alpha^+$ DC in der Milz *ex vivo* analysiert werden. Diese Experimente könnten mittels Immunstimulation (CpG-Injektion) erweitert werden und klären, ob AnxA1 in Abhängigkeit von LRP1 die pro-inflammatorische Immunantwort beeinflusst.

Eine interessante Erweiterung der Phagozytosestudien wären außerdem Experimente zur Kreuzpräsentation. Hierfür könnten die bereits erwähnten S2-Zellen, die neben dem murinen AnxA1 zusätzlich das Modellantigen Ovalbumin (OVA) exprimieren, genutzt und in LRP WT- oder LRP1 KO-Mäuse injiziert werden. Im Anschluss an die Injektion der apoptotischen S2-Zellen würden CFSE-gefärbte, OVA-spezifische $CD8^+$ (OT-I) injiziert werden, die durch MHC-I-Präsentation des OVA-Peptids auf APCs aktiviert werden. Die daraus resultierende Proliferation der T-Zellen kann anschließend basierend auf der CFSE-Verdünnung mittels Durchflusszytome-

ter gemessen werden. Prinzipiell ließen sich diese Versuche auch mit aus Knochenmark *in vitro* generierten DC durchführen. Diese sind jedoch CD8 α ⁻ und somit eventuell wenig effizient im Hinblick auf die Kreuzpräsentation.

Sofern die genannten Experimente auch *in vivo* die Relevanz des AnxA1-LRP1-Komplex bestätigen, wäre von großem Interesse, ob ähnlich wie bei der Immunsuppression auch hier verschiedene Annexine eine redundante Funktion ausüben. Diverse Bindungsstudien haben im Rahmen dieser Arbeit bereits belegt, dass auch AnxA5 und AnxA13 sowie die humane und murine Kerndomäne prinzipiell in der Lage sind, LRP1 zu binden, was auf eine Redundanz der Funktion hindeutet. Somit sollten sämtliche Phagozytosestudien auf die anderen Annexine ausgeweitet werden. Des Weiteren wäre die Bindungsdomäne der jeweiligen Annexine innerhalb der LRP1 α -Kette von Interesse. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob gemäß der stöchiometrischen Berechnungen mehrere Annexin-Bindungsstellen innerhalb eines LRP1-Moleküls existieren. Die LRP1-Cluster II, III und IV sind kommerziell als Fc-Chimäre erhältlich und könnten somit in *quartz crystal microbalance* Studien oder im ELISA in Kombination mit den verschiedenen Annexinen analysiert werden.

Klinische Relevanz der AnxA1-LRP1 Interaktion

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit tragen zum besseren Verständnis der molekularen Abläufe der Phagozytose bei. Dennoch lassen sie sich schwierig in einem therapeutischen oder diagnostischen Kontext anwenden. Sowohl die Menge des AnxA1 auf apoptotischen Zellen, als auch die Menge an LRP1 auf dem Phagozyten lässt sich im Organismus von außen nur schwierig manipulieren. Hierfür müsste beispielsweise zunächst der Translokationsmechanismus des AnxA1 auf die Oberfläche der apoptotischen Zelle identifiziert werden. Selbst, wenn in einem Patienten mit Autoimmunerkrankung ein Defekt der Efferozytose festgestellt wird, kann somit die Beseitigung der akkumulierten apoptotischen Zellen auf Basis der AnxA1-LRP1-Interaktion nicht beeinflusst werden. Die einzig denkbare Möglichkeit wäre eine induzierte Hochregulation von LRP1 auf der Phagozytenoberfläche im Patienten. Dadurch könnte mehr AnxA1 auf der apoptotischen Zellen gebunden und dadurch wiederum könnten mehr apoptotischen Zellen phagozytiert werden. Nilsson und Kollegen zeigten bereits *in vitro*, dass mittels des Glucocorticoids Dexamethason die LRP1-Expression positiv reguliert werden kann und dies zu einer erhöhten Efferozytoserate in primären murinen Makrophagen führt²⁰¹. Interessanterweise kann auch die AnxA1-Expression mittels Glucocorticoidverabreichung erhöht werden⁸¹, so dass eventuell mittels einer Dexamethason-Therapie gleichzeitig die Menge beider Interaktionspartner erhöht wird

5 - Diskussion

und dadurch die Efferozytose verstärkt werden könnte. Dexamethason wird bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie SLE und RA erfolgreich angewandt und womöglich basiert ein Teil der Wirkung auf dem Einfluss des AnxA1-LRP1-Komplex²⁰⁵⁻²⁰⁸. Die Ergebnisse von Nilsson *et al.*, wurden bislang jedoch nicht *in vivo* validiert und bedürfen somit weiterer Studien in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung.

6 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K. *Janeway's immunobiology*. (Garland Science, 2012).
2. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
3. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313–8 (1999).
4. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–61 (2010).
5. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
6. Cooper, M. D. & Alder, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–22 (2006).
7. Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* **5**, 85–87 (1995).
8. Maderna, P. & Godson, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1639**, 141–151 (2003).
9. Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G. & Ravichandran, K. S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 166–80 (2014).
10. Ravichandran, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* **207**, 1807–17 (2010).
11. Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. A. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* **11**, R795–805 (2001).
12. Elliott, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **461**, 282–6 (2009).
13. Henson, P. M. & Hume, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* **27**, 244–50 (2006).
14. Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. Cell death in development. *Cell* **96**, 245–54 (1999).
15. Ravichandran, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–55 (2011).
16. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059–70 (2010).
17. Parnaik, R., Raff, M. C. & Scholes, J. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr. Biol.* **10**, 857–60 (2000).
18. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 965–75 (2002).
19. Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M. & Wesselborg, S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol. Cell* **14**, 277–87 (2004).
20. Gude, D. R. *et al.* Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. *FASEB J.* **22**, 2629–38 (2008).
21. Lauber, K. *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* **113**, 717–30 (2003).

6 - Literaturverzeichnis

22. Truman, L. A. *et al.* CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* **112**, 5026–36 (2008).
23. Weigert, A. *et al.* Cleavage of sphingosine kinase 2 by caspase-1 provokes its release from apoptotic cells. *Blood* **115**, 3531–40 (2010).
24. Bournazou, I. *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J. Clin. Invest.* **119**, 20–32 (2009).
25. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. & Henson, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* **5**, 551–62 (1998).
26. Park, S.-Y. *et al.* Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* **15**, 192–201 (2008).
27. Park, D. *et al.* BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**, 430–4 (2007).
28. Kobayashi, N. *et al.* TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* **27**, 927–40 (2007).
29. DeKruyff, R. H. *et al.* T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* **184**, 1918–30 (2010).
30. Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–9 (2007).
31. Scott, R. S. *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207–11 (2001).
32. Ishimoto, Y., Ohashi, K., Mizuno, K. & Nakano, T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J. Biochem.* **127**, 411–7 (2000).
33. Hanayama, R., Miyasaka, K., Nakaya, M. & Nagata, S. MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure. *Curr. Dir. Autoimmun.* **9**, 162–72 (2006).
34. Hanayama, R. *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–7 (2002).
35. Arur, S. *et al.* Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev. Cell* **4**, 587–98 (2003).
36. Biswas, S. K. & Hoque, N. Efferocytosis : the Removal of Apoptotic Cells by Phagocytes. 2006 (2006).
37. Nauta, A. J. *et al.* Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 3044–50 (2004).
38. Brown, S. *et al.* Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* **418**, 200–3 (2002).
39. Gardai, S. J. *et al.* Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* **123**, 321–34 (2005).
40. Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 353–63 (2009).
41. Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350–1 (1997).
42. Blachère, N. E., Darnell, R. B. & Albert, M. L. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol.* **3**, e185 (2005).
43. Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 280–9 (2010).

44. Kawane, K. *et al.* Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**, 998–1002 (2006).
45. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
46. Den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 1685–96 (2000).
47. Villadangos, J. A. & Shortman, K. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1131–4 (2010).
48. Amigorena, S. & Savina, A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 109–17 (2010).
49. Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476–83 (2006).
50. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 677–704 (2008).
51. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646–55 (2009).
52. Xing, Y. & Hogquist, K. A. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
53. Bouneaud, C., Kourilsky, P. & Bousso, P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* **13**, 829–40 (2000).
54. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 21–7 (2010).
55. Kurts, C., Miller, J. F., Subramaniam, R. M., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* **188**, 409–14 (1998).
56. Kearney, E. R. *et al.* Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J. Immunol.* **155**, 1032–6 (1995).
57. Perez, V. L. *et al.* Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**, 411–7 (1997).
58. Greenwald, R. J., Boussiotis, V. A., Lorschach, R. B., Abbas, A. K. & Sharpe, A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* **14**, 145–55 (2001).
59. Fife, B. T. *et al.* Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J. Exp. Med.* **203**, 2737–47 (2006).
60. Nishimura, H. & Honjo, T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* **22**, 265–8 (2001).
61. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–86 (2003).
62. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–29 (2009).
63. Hughes, P. D. *et al.* Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* **28**, 197–205 (2008).
64. Hutcheson, J. *et al.* Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* **28**, 206–17 (2008).
65. Weant, A. E. *et al.* Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity* **28**, 218–30 (2008).

6 - Literaturverzeichnis

66. Hashimoto, D., Miller, J. & Merad, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* **35**, 323–35 (2011).
67. Steinman, R. M. *et al.* Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 15–25 (2003).
68. Rutella, S., Danese, S. & Leone, G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **108**, 1435–40 (2006).
69. Huang, F. P. *et al.* A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**, 435–44 (2000).
70. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769–79 (2001).
71. Ferenbach, D. & Hughes, J. Macrophages and dendritic cells: what is the difference? *Kidney Int.* **74**, 5–7 (2008).
72. Lin, H.-H. *et al.* The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J. Exp. Med.* **201**, 1615–25 (2005).
73. Rothoefl, T., Gonschorek, A., Bartz, H., Anhenh, O. & Schauer, U. Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells. *Immunology* **110**, 430–439 (2003).
74. Guan, Y. *et al.* Antigen presenting cells treated in vitro by macrophage colony-stimulating factor and autoantigen protect mice from autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* **192**, 68–78 (2007).
75. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–95 (2012).
76. Mills, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 463–88 (2012).
77. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 557–63 (2011).
78. Crumpton, M. J. & Dedman, J. R. Protein terminology tangle. *Nature* **345**, 212 (1990).
79. Konopka-Postupolska, D., Clark, G. & Hofmann, A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. *Plant Sci.* **181**, 230–41 (2011).
80. Walther, A., Riehemann, K. & Gerke, V. A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor. *Mol. Cell* **5**, 831–840 (2000).
81. Gerke, V. & Moss, S. E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* **82**, 331–71 (2002).
82. Hayes, M. J., Rescher, U., Gerke, V. & Moss, S. E. Annexin-actin interactions. *Traffic* **5**, 571–6 (2004).
83. Weyd, H. *et al.* Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *PLoS One* **8**, e62449 (2013).
84. Dreier, R., Schmid, K. W., Gerke, V. & Riehemann, K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 137–48 (1998).
85. D'Acquisto, F., Perretti, M. & Flower, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 152–69 (2008).
86. Morand, E. F. *et al.* Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, 195–202 (1995).
87. Moss, S. E. & Morgan, R. O. The annexins. *Genome Biol.* **5**, 219 (2004).

88. Weng, X. *et al.* Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci.* **2**, 448–58 (1993).
89. Rosengarth, A. & Luecke, H. A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J. Mol. Biol.* **326**, 1317–25 (2003).
90. Rosengarth, A., Gerke, V. & Luecke, H. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J. Mol. Biol.* **306**, 489–98 (2001).
91. Coméra, C. & Russo-Marie, F. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 1043–7 (1995).
92. Wallner, B. P. *et al.* Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* **320**, 77–81
93. Philip, J. G., Flower, R. J. & Buckingham, J. C. Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1. *Regul. Pept.* **73**, 133–9 (1998).
94. Rescher, U., Goebeler, V., Wilbers, A. & Gerke, V. Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1320–4 (2006).
95. Cirino, G. *et al.* Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 573–4 (1993).
96. Tsao, F. H., Meyer, K. C., Chen, X., Rosenthal, N. S. & Hu, J. Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 120–8 (1998).
97. Smith, S. F., Tetley, T. D., Guz, A. & Flower, R. J. Detection of lipocortin 1 in human lung lavage fluid: lipocortin degradation as a possible proteolytic mechanism in the control of inflammatory mediators and inflammation. *Environ. Health Perspect.* **85**, 135–44 (1990).
98. Davidson, F. F., Lister, M. D. & Dennis, E. A. Binding and inhibition studies on lipocortins using phosphatidylcholine vesicles and phospholipase A2 from snake venom, pancreas, and a macrophage-like cell line. *J. Biol. Chem.* **265**, 5602–9 (1990).
99. Kim, S. W. *et al.* Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J. Biol. Chem.* **276**, 15712–9 (2001).
100. Lim, L. H., Solito, E., Russo-Marie, F., Flower, R. J. & Perretti, M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14535–9 (1998).
101. Walther, A., Riehemann, K. & Gerke, V. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol. Cell* **5**, 831–40 (2000).
102. Fan, X., Krahlting, S., Smith, D., Williamson, P. & Schlegel, R. A. Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2863–72 (2004).
103. Maderna, P., Yona, S., Perretti, M. & Godson, C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J. Immunol.* **174**, 3727–33 (2005).
104. Blume, K. E. *et al.* Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. *J. Immunol.* **183**, 8138–47 (2009).
105. Kusumawati, A., Liautard, J. P. & Sri Widada, J. Implication of annexin 1 in phagocytosis: effects of n-terminal domain deletions and point mutations of the phosphorylation site Ser-27. *Cell Biol. Int.* **25**, 809–13 (2001).
106. McArthur, S. *et al.* Annexin A1: a central player in the anti-inflammatory and neuroprotective role of microglia. *J. Immunol.* **185**, 6317–28 (2010).

6 - Literaturverzeichnis

107. D'Acquisto, F. *et al.* Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood* **109**, 1095–102 (2007).
108. D'Acquisto, F. *et al.* Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3131–42 (2007).
109. Yang, Y. H. *et al.* Deficiency of annexin A1 in CD4+ T cells exacerbates T cell-dependent inflammation. *J. Immunol.* **190**, 997–1007 (2013).
110. Perretti, M. & D'Acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 62–70 (2009).
111. Roviezzo, F. *et al.* The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 541–53 (2002).
112. Damazo, A. S. *et al.* Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am. J. Pathol.* **166**, 1607–17 (2005).
113. Christian, H. C., Taylor, A. D., Flower, R. J., Morris, J. F. & Buckingham, J. C. Characterization and localization of lipocortin 1-binding sites on rat anterior pituitary cells by fluorescence-activated cell analysis/sorting and electron microscopy. *Endocrinology* **138**, 5341–51 (1997).
114. Goulding, N. J., Pan, L., Wardwell, K., Guyre, V. C. & Guyre, P. M. Evidence for specific annexin I-binding proteins on human monocytes. *Biochem. J.* **316** (Pt 2, 593–7 (1996).
115. Perretti, M., Getting, S. J., Solito, E., Murphy, P. M. & Gao, J. L. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am. J. Pathol.* **158**, 1969–73 (2001).
116. Migeotte, I., Communi, D. & Parmentier, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 501–19 (2006).
117. Ernst, S. *et al.* An Annexin 1 N-Terminal Peptide Activates Leukocytes by Triggering Different Members of the Formyl Peptide Receptor Family. *J. Immunol.* **172**, 7669–7676 (2004).
118. Gavins, F. N. E., Yona, S., Kamal, A. M., Flower, R. J. & Perretti, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* **101**, 4140–7 (2003).
119. Hayhoe, R. P. G. *et al.* Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* **107**, 2123–30 (2006).
120. Karlsson, J. *et al.* Neutrophil NADPH-oxidase activation by an annexin A1 peptide is transduced by the formyl peptide receptor (FPR), whereas an inhibitory signal is generated independently of the FPR family receptors. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 762–71 (2005).
121. Perretti, M. *et al.* Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat. Med.* **8**, 1296–302 (2002).
122. Pupjalis, D., Goetsch, J., Kottas, D. J., Gerke, V. & Rescher, U. Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol. Med.* **3**, 102–14 (2011).
123. Yang, D. *et al.* Differential regulation of responsiveness to fMLP and C5a upon dendritic cell maturation: correlation with receptor expression. *J. Immunol.* **165**, 2694–702 (2000).
124. Yang, D., Chen, Q., Le, Y., Wang, J. M. & Oppenheim, J. J. Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* **166**, 4092–8 (2001).

125. Yang, D. *et al.* Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-like-2 (FPRL2) throughout maturation. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 598–607 (2002).
126. Herr, C. *et al.* Loss of annexin A7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4119–28 (2001).
127. Brachvogel, B. *et al.* Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2907–13 (2003).
128. Hayes, M. J. & Moss, S. E. Annexins and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1166–70 (2004).
129. Guo, C., Liu, S. & Sun, M.-Z. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncol.* **9**, 1773–93 (2013).
130. Wu, N., Liu, S., Guo, C., Hou, Z. & Sun, M.-Z. The role of annexin A3 playing in cancers. *Clin. Transl. Oncol.* **15**, 106–10 (2013).
131. Guo, C., Liu, S., Greenaway, F. & Sun, M.-Z. Potential role of annexin A7 in cancers. *Clin. Chim. Acta.* **423**, 83–9 (2013).
132. Fatimathas, L. & Moss, S. E. Annexins as disease modifiers. *Histol. Histopathol.* **25**, 527–32 (2010).
133. Akama, H., Tanaka, H. & Kawai, S. Possible mechanisms of glucocorticoid--unresponsive pyrexia. Defect in lipocortin 1? *Mater. Med. Pol.* **27**, 75–8
134. Garcia-Gonzalez, A. & Weisman, M. H. The arthritis of familial Mediterranean fever. *Semin. Arthritis Rheum.* **22**, 139–50 (1992).
135. Goulding, N. J. *et al.* Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 843–50 (1989).
136. Kretz, C. C. *et al.* Anti-annexin 1 antibodies: a new diagnostic marker in the serum of patients with discoid lupus erythematosus. *Exp. Dermatol.* **19**, 919–21 (2010).
137. Herz, J. *et al.* Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* **7**, 4119–27 (1988).
138. Ashcom, J. D. The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J. Cell Biol.* **110**, 1041–1048 (1990).
139. Moestrup, S. K. & Gliemann, J. Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 15574–15577 (1989).
140. Kristensen, T. *et al.* Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the g-macroglobulin receptor ry. **276**, 151–155 (1990).
141. Lillis, A. P., Duyn, L. B. V. A. N., Murphy-ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL Receptor-Related Protein 1 : Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. 887–918 (2008). doi:10.1152/physrev.00033.2007.
142. Herz, J., Clouthier, D. E. & Hammer, R. E. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411–21 (1992).
143. Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* **88**, 887–918 (2008).
144. Liu, Q. *et al.* LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol. Neurodegener.* **4**, 17 (2009).
145. Zurhove, K., Nakajima, C., Herz, J., Bock, H. H. & May, P. Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci. Signal.* **1**, ra15 (2008).

6 - Literaturverzeichnis

146. Zhou, Z., Hartweg, E. & Horvitz, H. R. CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**, 43–56 (2001).
147. Su, H. P. *et al.* Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.* **277**, 11772–9 (2002).
148. Kinchen, J. M. *et al.* Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* **434**, 93–9 (2005).
149. Patel, M. *et al.* The cytoplasmic domain of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein, but not that of the LDL receptor, triggers phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 44799–807 (2003).
150. Ogden, C. a *et al.* C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 781–95 (2001).
151. Bohlsón, S. S., Fraser, D. A. & Tenner, A. J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol.* **44**, 33–43 (2007).
152. Gardai, S. J. *et al.* By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* **115**, 13–23 (2003).
153. Overton, C. D., Yancey, P. G., Major, A. S., Linton, M. F. & Fazio, S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ. Res.* **100**, 670–7 (2007).
154. Hu, L. *et al.* Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2710–5 (2006).
155. Subramaniam, M. *et al.* An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. *J. Clin. Invest.* **124**, 1296–308 (2014).
156. Nakayama, M. *et al.* Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* **113**, 3821–30 (2009).
157. Nagata, K. *et al.* Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 30022–7 (1996).
158. Fuentealba, R. A. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS One* **5**, e11884 (2010).
159. Martiskainen, H. *et al.* Targeting ApoE4/ApoE receptor LRP1 in Alzheimer's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 781–94 (2013).
160. Gaultier, A. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. *J. Cell Sci.* **122**, 1155–62 (2009).
161. Fernandez-Castaneda, A. *et al.* Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. *J. Biol. Chem.* **288**, 4538–48 (2013).
162. Gorovoy, M., Gaultier, A., Campana, W. M., Firestein, G. S. & Gonias, S. L. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 769–78 (2010).
163. Getting, S. J., Flower, R. J. & Perretti, M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 1075–82 (1997).

164. Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11020–4 (2002).
165. Mohibullah, N. & Hahn, S. Site-specific cross-linking of TBP in vivo and in vitro reveals a direct functional interaction with the SAGA subunit Spt3. *Genes Dev.* **22**, 2994–3006 (2008).
166. Zhang, N., Joly, N. & Buck, M. A common feature from different subunits of a homomeric AAA+ protein contacts three spatially distinct transcription elements. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9139–52 (2012).
167. Sato, S. *et al.* Crystallographic study of a site-specifically cross-linked protein complex with a genetically incorporated photoreactive amino acid. *Biochemistry* **50**, 250–7 (2011).
168. Forné, I., Ludwigsen, J., Imhof, A., Becker, P. B. & Mueller-Planitz, F. Probing the conformation of the ISWI ATPase domain with genetically encoded photoreactive crosslinkers and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.012088 (2012).
169. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* **1**, e00049 (2012).
170. Tolia, N. H. & Joshua-Tor, L. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat. Methods* **3**, 55–64 (2006).
171. Palomares, L. a, Estrada-Mondaca, S. & Ramírez, O. T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* **267**, 15–52 (2004).
172. Spring, C. *et al.* Photo-cross-linking interacting proteins with a genetically encoded benzophenone. **2**, 377–384 (2005).
173. Argent, A. C. *et al.* A family showing recessively inherited multisystem pathology with aberrant splicing of the erythrocyte Band 7.2b ('stomatatin') gene. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 29–46 (2004).
174. Fricke, B. *et al.* The "stomatatin" gene and protein in overhydrated hereditary stomatocytosis. *Blood* **102**, 2268–77 (2003).
175. Snyers, L. Oligomeric Nature of the Integral Membrane Protein Stomatatin. *J. Biol. Chem.* **273**, 17221–17226 (1998).
176. Mairhofer, M., Steiner, M., Mosgoeller, W., Prohaska, R. & Salzer, U. Stomatatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules. *Blood* **100**, 897–904 (2002).
177. ERARD, M. S., BELENGUER, P., CAIZERGUES-FERRER, M., PANTALONI, A. & AMALRIC, F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* **175**, 525–530 (1988).
178. Tuteja, R. & Tuteja, N. Nucleolin: A Multifunctional Major Nucleolar Phosphoprotein. (2008). at <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10409239891204260>>
179. Hirano, K. *et al.* A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 39284–93 (2005).
180. Daniel, T. O., Schneider, W. J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J. Biol. Chem.* **258**, 4606–11 (1983).
181. Lillis, A. P. *et al.* Murine Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP) Is Required for Phagocytosis of Targets Bearing LRP Ligands but Is Not Required for C1q-Triggered Enhancement of Phagocytosis. *J. Immunol.* **181**, 364–373 (2008).
182. Lim, L. H. K. & Pervaiz, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* **21**, 968–75 (2007).
183. *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases.* (Springer Netherlands, 2009). doi:10.1007/978-1-4020-9293-0

6 - Literaturverzeichnis

184. Baneyx, F. & Palumbo, J. L. Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol. Biol.* **205**, 171–97 (2003).
185. De Marco, A. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat. Protoc.* **2**, 2632–9 (2007).
186. Beck, R. *et al.* Coatomer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J. Cell Biol.* **194**, 765–77 (2011).
187. Hino, N. *et al.* Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nat. Methods* **2**, 201–6 (2005).
188. D'Acunto, C. W., Gbelcova, H., Festa, M. & Ruml, T. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. *Cell. Signal.* **26**, 173–8 (2014).
189. Mailliard, W. S., Luecke, H. & Haigler, H. T. Annexin XII forms calcium-dependent multimers in solution and on phospholipid bilayers: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* **36**, 9045–50 (1997).
190. Concha, N. O., Head, J. F., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. & Seaton, B. A. Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipid vesicles. *FEBS Lett.* **314**, 159–62 (1992).
191. Crosby, K. C. *et al.* Quantitative analysis of self-association and mobility of annexin A4 at the plasma membrane. *Biophys. J.* **104**, 1875–85 (2013).
192. Vash, B., Phung, N., Zein, S. & DeCamp, D. Three complement-type repeats of the low-density lipoprotein receptor-related protein define a common binding site for RAP, PAI-1, and lactoferrin. *Blood* **92**, 3277–85 (1998).
193. MacEwan, D. J. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 855–75 (2002).
194. Truneh, A. *et al.* Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 23319–25 (2000).
195. Hatherley, D., Cherwinski, H. M., Moshref, M. & Barclay, A. N. Recombinant CD200 Protein Does Not Bind Activating Proteins Closely Related to CD200 Receptor. *J. Immunol.* **175**, 2469–2474 (2005).
196. Dalli, J. *et al.* Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J.* **26**, 387–96 (2012).
197. Cook, R., Stanford, J. & Earp, S. Apoptotic cell clearance lies at the interface of post-lactational involution and breast cancer. *Cancer Res.* **72**, P6–02–01–P6–02–01 (2012).
198. Pujol-Autonell, I. *et al.* Efferocytosis promotes suppressive effects on dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity. *PLoS One* **8**, e63296 (2013).
199. Korn, D., Frasnich, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M. & Bratton, D. L. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front. Immunol.* **2**, 57 (2011).
200. Novak, M. L. & Thorp, E. B. Shedding light on impaired efferocytosis and nonresolving inflammation. *Circ. Res.* **113**, 9–12 (2013).
201. Nilsson, A., Vesterlund, L. & Oldenborg, P.-A. Macrophage expression of LRP1, a receptor for apoptotic cells and unopsonized erythrocytes, can be regulated by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 1304–9 (2012).
202. Duus, K. *et al.* Direct interaction between CD91 and C1q. *FEBS J.* **277**, 3526–37 (2010).
203. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 51–72 (2013).

204. Henson, P. M. & Bratton, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2773–4 (2013).
205. Verhoef, C. M., van Roon, J. A., Vianen, M. E., Lafeber, F. P. & Bijlsma, J. W. The immune suppressive effect of dexamethasone in rheumatoid arthritis is accompanied by upregulation of interleukin 10 and by differential changes in interferon gamma and interleukin 4 production. *Ann. Rheum. Dis.* **58**, 49–54 (1999).
206. Yuan, F. *et al.* Dexamethasone prodrug treatment prevents nephritis in lupus-prone (NZB × NZW)F1 mice without causing systemic side effects. *Arthritis Rheum.* **64**, 4029–39 (2012).
207. Dhabhai, R., Kalla, G., Singhi, M. K., Ghiya, B. C. & Kachhawa, D. Study Dexamethasone-cyclophosphamide pulse therapy in systemic lupus erythematosus. **71**, 9–13 (2005).
208. Meyer, O., Stahl, D., Beckhove, P., Huhn, D. & Salama, A. Pulsed high-dose dexamethasone in chronic autoimmune haemolytic anaemia of warm type. *Br. J. Haematol.* **98**, 860–2 (1997).

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
AICD	<i>Activated induced cell death</i>
aJ	Apoptotische Jurkat T-Zellen
Amb	<i>Amber</i>
Anx	Annexin
APC	<i>antigen presenting cell</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
Axl	Tyrosinkinase-Rezeptor UFO
BAI	<i>Brain-specific-angiogenesis-factor</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i>
BMDM	<i>Bone marrow derived macrophage</i>
Ca ²⁺	Calcium ²⁺
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
CD62L	CD62 Ligand
cDNA	Komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CpG	Unmethyliertes ODN mit CpG Motiv
cPLA2	Cytosolische Phospholipase A2
CRT	Calreticulin
CSF1-R	<i>Colony-stimulating factor 1 receptor</i>
CXCL3	Chemokin (CXC3 Motiv) Ligand 1
DC	<i>Dendritic cell</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
SulfoNHS	N-hydroxysuccinimid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Flow cytometry associated cell sorting</i>

Abkürzung	Erklärung
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
Gas6	<i>Growth-arrest specific protein 6</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	<i>G-protein-coupled-receptor</i>
GPI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IP	Immunpräzipitation
IZD	Intrazelluläre Domäne
k _a	Assoziationskonstante
k _d	Dissoziationskonstante
KO	<i>Knock out</i>
LAL	<i>Limulus amoebocyte lysate</i>
LOX	<i>Oxidised low density lipoprotein</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
LRP	<i>Low density lipoprotein like protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
Mer-TK	Mer-Tyrosinkinase
MFG-E8	<i>Milk fat globule EGF factor 8</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>Non-obese-diabetic</i>
OT-I/II	OVA-spezifische CD8 ⁺ /CD4 ⁺ T-Zellen
OVA	Ovalbumin
pAzf	Para-Azido-Phenylalanin
pBpa	Para-Benzoyl-Phenylalanin

Abkürzung	Erklärung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PD-L1/2	<i>Programmed death ligand 1/2</i>
PRMT6	Protein Arginin Methyltransferase 6
PS	Phosphatidylserin
RA	Rheumatoide Arthritis
Rac	Rho GTPasen
Ranbp9	RAN-bindendes Protein
RAP	<i>Receptor-associated protein</i>
RNA	Ribonucleinsäure
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SCARF-1	<i>Scavenger receptor class F member 1</i>
sec	Sekunden
SIRP α	<i>Signal-regulatory protein alpha</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
sLRP1	<i>soluble LRP1</i>
SP-A/D	Sphingosin-A
sPLA2	Sezernierte Phospholipase A2
SRA	<i>Scavenger receptor class A</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAP1/2	<i>Transporter-associated with Antigen Processing 1/2</i>
TGF- β	<i>Tumor-growth-factor 1</i>
T _H	T-Helferzelle
Tim	<i>T-cell-immunglobulin-and-mucin-domain containing-molecule</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor-necrosis-factor α</i>
TRAIL	<i>TNF-receptor-associated interacting ligand</i>
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TSP-1	Thrombospondin-1
TZR	T-Zell-Rezeptor
UTP	Uracil-Triphosphat
UV	Ultraviolett
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WT	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 -	Verschiedene Schritte der Efferozytose.....	4
Abb. 1.2 -	Übersicht der Phagozytoserezeptoren für die Erkennung apoptotischer Zellen.	7
Abb. 1.3 -	T-Zell-intrinsische Mechanismen der peripheren Toleranz.	11
Abb. 1.4 -	Charakteristika einer tolerogenen DC <i>in vitro</i>	13
Abb. 1.5 -	Übersicht der Charakteristika von DC und Makrophagen.	15
Abb. 1.6 -	AnxA1 Struktur.....	18
Abb. 1.7 -	Schematische Darstellung der LRP1-Struktur.	25
Abb. 1.8 -	LRP1 bindet Calreticulin (CRT) auf apoptotischen Zellen.	27
Abb. 4.1 -	Schematische Darstellung der Induktion einer kovalenten Bindung mittels pBpa.....	55
Abb. 4.2 -	Etablierung der Expression von pBpa-AnxA1.....	62
Abb. 4.3 -	Etablierung der pBpa-Kreuzvernetzungs-IP mit Raw264.7.	65
Abb. 4.4 -	LRP1 Expression in verschiedenen Zelltypen.	69
Abb. 4.5 -	Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels IP.	71
Abb. 4.6 -	Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels ELISA.....	73
Abb. 4.7 -	Validierung der Interaktion zwischen AnxA1 und LRP1 mittels Liganden und Rezeptor Blot.	76
Abb. 4.8 -	Bestimmung der Bindungsaffinitäten mittels Oberflächenplasmonresonanz..	81
Abb. 4.9 -	AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-induzierte Aktivierung in primären murinen BMDM.....	84
Abb. 4.10 -	AnxA1 supprimiert LRP1-unabhängig die TLR-induzierte Aktivierung in primären murinen BMDC.	86
Abb. 4.11 -	Die Efferozytose in professionellen und nicht-professionellen Phagozyten erfolgt unabhängig von AnxA1.....	88
Abb. 4.12 -	Die Phagozytose von Beads ist abhängig vom AnxA1-LRP1-Komplex.....	90

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel wurden für die Erstellung dieser Arbeit verwendet. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, Oktober 2014