

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Lucie Dörner
aus München

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Einfluss
von apoptotischen Zellen und Annexin 1
auf Immunantwort und periphere Toleranz

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Krammer
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Prof. Dr. Felix Wieland
(Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg)

Tenter sans force et sans armure
D'atteindre l'inaccessible étoile.

Jacques Brel, La Quête

Danksagung

Zunächst möchte ich Peter H. Krammer für die Betreuung der Arbeit danken, für konstruktive Kritik, wenn die Arbeit gut voran kam, und für aufmunternde Worte, wenn es mal nicht so gut lief, für seine Geschichten aus 30 Jahren immunologischer Forschung und für einen kritischen Blick auf Daten und Ergebnisse.

Felix Wieland danke ich für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Universität Heidelberg und für seine rege Anteilnahme am Fortschreiten des Projektes. Als drittem Mitglied meines Promotionskomitees möchte ich mich bei Bernd Arnold bedanken, der immer ein Ohr für Probleme und Zeit für einen guten Rat hatte. Außerdem danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes, die diese Arbeit in weiten Teilen mit einem Promotionsstipendium großzügig unterstützt hat.

Wissenschaftliches Arbeiten lebt von der Diskussion in der Gruppe. Dafür möchte ich mich herzlich bei allen anderen „Annexinen“ bedanken, bei Heiko Weyd, Dagmar Rieß, Andrea Mahr und Björn Linke. Bartec Berger, Cosima Kretz und Annegret Kuhn danke ich für die Zusammenarbeit im Lupus-Projekt. Ein ganz besonderer Dank gilt Daniela Muth, deren fabelhafte technische Unterstützung wesentlich zum Gelingen der Experimente im Maussystem beigetragen hat.

Auch außerhalb der eigenen Arbeitsgruppe habe ich Unterstützung gefunden. Ich bedanke mich bei Gerd Moldenhauer für Rat und Tat bei der Hybridomherstellung und bei Christine Falk für ihre Hilfe bei der Bioplex-Analyse.

Zu einer gelungenen Doktorarbeit gehören nicht nur die Ergebnisse, sondern auch eine gute Atmosphäre im Labor. Für den Zusammenhalt und die gute Stimmung möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Krammer bedanken, insbesondere bei Nina Oberle, Nadine Eberhardt, Dirk Brenner, Christian Frey, Mareike Becker, Heiko Weyd, Bartec Berger und Julia Hoffmann. Heidi Sauter danke ich sowohl für ihre moralische als auch die administrative Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer darin unterstützt haben, eine akademische Laufbahn einzuschlagen, und bei Johannes, der die Hochs und Tiefs dieser Arbeit mit mir erlebt hat wie sonst niemand.

Zusammenfassung

Die periphere Toleranz umfasst verschiedene Mechanismen, die die Eliminierung oder das Abschalten potentiell autoreaktiver T-Zellen sicherstellen, die nicht durch die zentrale Toleranz im Thymus eliminiert wurden. Periphere T-Zellen werden abgeschaltet, wenn sie in einem Nicht-Gefahren-Kontext auf ihr MHC-präsentiertes Antigen treffen. Ein wichtiger Mechanismus der peripheren Toleranz ist das Abschalten autoreaktiver T-Zellen durch dendritische Zellen, die Selbstantigene aus zuvor phagocytierten apoptotischen Zellen präsentieren. Welche Moleküle auf der Oberfläche apoptotischer Zellen ein anti-inflammatorisches Signal an dendritische Zellen weitergeben, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Als möglicher Vermittler dieses anti-inflammatorischen Signals wurde in unserer Arbeitsgruppe das Protein Annexin 1 identifiziert, das in einem frühen Stadium der Apoptose aus dem Cytosol an die Zelloberfläche transloziert wird (Weyd 2005).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Annexin 1 bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals von apoptotischen Zellen zu dendritischen Zellen eine Rolle spielt und ob dies zu einer veränderten T-Zell-Antwort führt. Als experimentelles System wurden U937-Zellen (als ein Modell für dendritische Zellen) bzw. primäre murine dendritische Zellen mit apoptotischen Zellen bzw. rekombinantem Annexin 1 kultiviert.

Apoptotische Zellen unterdrücken die LPS-induzierte TNF-Sekretion von U937-Zellen, während die Sekretion von IL-10 nicht beeinflusst ist. Die Suppression ist zellkontaktabhängig und wird durch gegen Annexin 1 gerichtete Antikörper weitgehend aufgehoben. Analog supprimieren apoptotische murine Milzzellen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion primärer muriner dendritischer Zellen. Die Sekretion von TNF, IL-12 (p70) und IL-1 β ist verringert; während die Sekretion von IL-13 nicht beeinträchtigt ist. Rekombinantes Annexin 1 unterdrückt ebenfalls die pro-inflammatorische Cytokinsekretion von U937-Zellen und murinen dendritischen Zellen. Die Suppression wird wiederum durch Antikörper gegen Annexin 1 aufgehoben. Zudem reduziert rekombinantes Annexin 1 die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 auf der Oberfläche der murinen dendritischen Zellen. Die Expression von MHC II ist unverändert. Sowohl apoptotische Zellen als auch rekombinantes Annexin 1 induzieren einen veränderten Phänotyp der dendritischen Zellen, der nach Zugabe von Ovalbumin als Antigen zu einer verminderten Proliferation syngener ovalbuminspezifischer OT-II T-Zellen führt. Die T-Zellen sezernieren zudem geringere Mengen des pro-inflammatorischen

Cytokins IFN- γ .

Diese Daten zeigen, dass Annexin 1 auf apoptotischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals an dendritische Zellen spielt. Annexin 1 hemmt die Aktivierung der dendritischen Zellen und damit möglicherweise eine Proliferation potentiell autoreaktiver T-Zellen. Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, Antigene aus apoptotischen Zellen als ungefährlich zu kennzeichnen und in der Peripherie autoreaktive T-Zellen abzuschalten oder zu eliminieren.

Abstract

Peripheral tolerance comprises several mechanisms that ensure the elimination or silencing of potentially auto-reactive T cells that have escaped thymic selection. Peripheral T cells are silenced when they encounter self-antigen presented on MHC molecules in a non-danger context. One important source of auto-antigens are apoptotic cells that have been engulfed by dendritic cells. It has, however, not been fully understood which signals on apoptotic cells determine the non-reactivity against self. Annexin 1, a protein that translocates from the cytosol to the surface of early apoptotic cells, has been identified in our group as a possible mediator of this anti-inflammatory effect (Weyd 2005).

The aim of this study was to investigate whether annexin 1 on the surface of apoptotic cells mediates an anti-inflammatory signal to dendritic cells and if a possible signal leads to a change in the stimulation of T cells by dendritic cells. To this end, a coculture system was established comprising U937 cells (as a model for dendritic cells) or primary murine dendritic cells and apoptotic cells or recombinant annexin 1.

Apoptotic cells suppress the LPS-induced TNF secretion of U937 cells whereas the secretion of IL-10 is not influenced. The suppression is cell contact-dependent and can be abrogated by polyclonal antibodies directed against annexin 1. In analogy, apoptotic murine splenocytes suppress the pro-inflammatory cytokine secretion of primary murine dendritic cells. The secretion of TNF, IL-1 β and IL-12 (p70) is reduced whereas the secretion of IL-13 is not altered. Recombinant annexin 1 also reduces the pro-inflammatory cytokine secretion of U937 cells and of murine dendritic cells. Again, the suppression is abrogated by polyclonal antibodies directed against annexin 1. Furthermore, recombinant annexin 1 reduces the LPS-induced surface expression of the costimulatory molecules CD86 and CD40 while the expression of MHC II remains constant. Dendritic cells that are incubated with apoptotic cells or annexin 1 and pulsed with ovalbumin as antigen show an altered phenotype that results in a reduced capability to stimulate syngeneic ovalbumin-specific OT-II T cells. The cells proliferate less and secrete a lower amount of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ .

Taken together, the data suggest that annexin 1 acts as an anti-inflammatory signal on the surface of apoptotic cells. The interaction between dendritic cells and annexin 1 suppresses the activation of dendritic cells and thereby their capacity to prime T cells. This mechanism might help to define antigens from apoptotic cells as harmless and switch off or eliminate autoreactive T cells in the periphery.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Zentrale und periphere immunologische Toleranz	5
1.3	Apoptose	12
1.4	Der Einfluss apoptotischer Zellen auf das Immunsystem	18
1.5	Annexin 1 als anti-inflammatorisches Molekül	22
2	Aufgabenstellung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.2	Methoden	38
4	Ergebnisse	59
4.1	U937 als System für die Untersuchung der Aktivierung dendritischer Zellen	59
4.2	Apoptotische Zellen hemmen zellkontaktabhängig die TNF-Sekretion von U937-Zellen	61
4.3	Die Hemmung der TNF-Sekretion wird durch Annexin 1 vermittelt	64
4.4	Annexin 1 hemmt die TNF-Sekretion von U937-Zellen	65
4.5	Der Antikörper 8D10 erkennt murines Annexin 1	68
4.6	Apoptotische Milzzellen hemmen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen	69
4.7	An Phosphatidylserin gebundenes Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen	72
4.8	Lösliches Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen	74
4.9	Annexin 1 reduziert die Expression kostimulatorischer Moleküle auf murinen dendritischen Zellen	76

4.10	Mit apoptotischen Zellen kokultivierte dendritische Zellen hemmen die Proliferation und IFN- γ -Produktion von T-Zellen	78
4.11	Mit Annexin 1 kultivierte dendritische Zellen hemmen die Proliferation und IFN- γ -Produktion von T-Zellen	81
5	Diskussion	82
5.1	Apoptotische Zellen hemmen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen	82
5.2	Die Hemmung der Cytokinsekretion wird durch Annexin 1 vermittelt	84
5.3	Annexin 1 hemmt die Reifung dendritischer Zellen	87
5.4	Apoptotische Zellen und Annexin 1 hemmen die T-Zell-Stimulation muriner dendritischer Zellen	91
5.5	Modell zur Rolle von Annexin 1 in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz	93
5.6	Ausblick	95
6	Literaturverzeichnis	98
7	Abkürzungsverzeichnis	107
8	Veröffentlichungen	109
9	Erklärung	110

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor eindringenden Pathogenen und hat sich im Laufe der Evolution zu einem leistungsfähigen Abwehrsystem gegen Pilze, Bakterien, Viren und Parasiten entwickelt. Die erste Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen bildet der mechanische Schutz der Haut. Die meisten Erreger dringen über Verletzungen der Haut oder über die anfälligeren Schleimhäute ein. Sowohl Haut als auch Schleimhäute sezernieren antibakterielle Substanzen wie Lysozym und Cryptidine und beherbergen kommensurale Bakterien, die ein Ansiedeln pathogener Bakterien erschweren. Gelingt es einem Pathogen dennoch, diese Barrieren zu überwinden, wird es im Körper mit den eigentlichen Komponenten des Immunsystems konfrontiert.

Angeborene und adaptive Immunität

Man unterscheidet das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem (Übersicht in Roitt 2001). In Abbildung 1.1 sind einige wichtige Komponenten des Immunsystems und ihre primären Funktionen dargestellt. Die Komponenten des angeborenen Immunsystems stehen sofort für eine Bekämpfung des eindringenden Pathogens zur Verfügung. Sie erkennen die Eindringlinge über pathogenassoziierte molekulare Muster, die evolutionär konserviert und vielfach an der Oberfläche bestimmter Pathogengruppen zu finden sind (Janeway 1989). Eindringende Erreger werden entweder direkt vom Komplementsystem lysiert oder mit Antikörpern für die Erkennung durch Makrophagen und Granulocyten markiert. Makrophagen und Granulocyten können die Pathogene lysieren, mit toxischen Substanzen zerstören oder phagozytieren. Natürliche Killerzellen lysieren körperfremde Zellen. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, die meisten bakteriellen Infektionen im Keim zu ersticken, ohne dass das adaptive Immunsystem einspringen muss. Viren und intrazelluläre Bakterien erfordern jedoch in der Regel den Einsatz der adaptiven Immunität, da die Erreger in den Zellen für die Komponenten des angeborenen Immunsystems in den meisten Fällen nicht sichtbar sind. Die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem ist relativ unspezifisch und läuft auch bei Reinfektion mit dem gleichen Erreger nach demselben Schema ab. Die angeborene Immunität bildet kein immunologisches Gedächtnis.

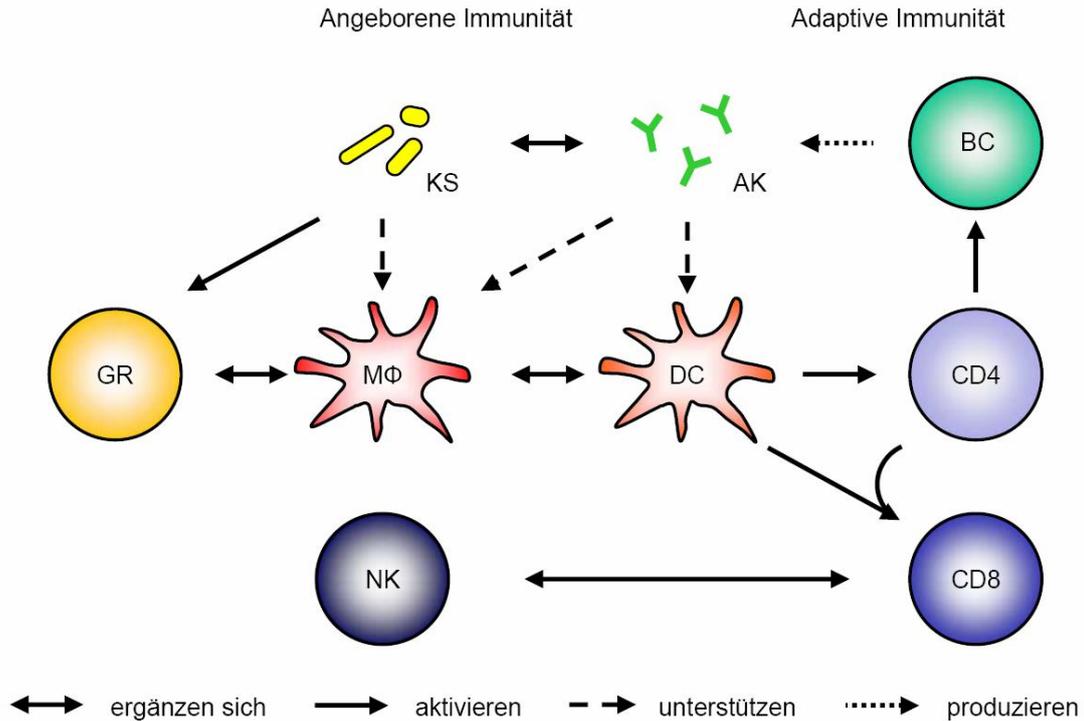


Abbildung 1.1: Angeborene und adaptive Immunität ergänzen sich in der Abwehr von Pathogenen.

Antikörper (AK) und Proteine des Komplementsystems (KS) markieren Pathogene und machen sie so sichtbar für Granulozyten (GR), Makrophagen (MΦ) und dendritische Zellen (DC). Granulozyten und Makrophagen nehmen die Pathogene auf und vernichten sie. Dendritische Zellenprozessieren das aufgenommene Material und präsentieren es CD4 T-Helfer-Zellen (CD4). CD4 T-Helfer-Zellen aktivieren B-Zellen (BC), die wiederum Antikörper produzieren. Gemeinsam mit den dendritischen Zellen aktivieren CD4 T-Helfer-Zellen zudem antigenspezifischen CD8 T-Killer-Zellen. Die T-Killer-Zellen ergänzen sich in ihrer Funktion mit den natürlichen Killerzellen (NK), die ebenfalls Zellen lysieren können.

Parallel zur Bekämpfung der Infektion leitet das angeborene Immunsystem Signale an die Komponenten des evolutionär jüngeren adaptiven Immunsystems weiter. Dendritische Zellen nehmen Pathogene oder ihre Komponenten auf und präsentieren sie CD4-Helfer-T-Zellen. Beide Zellen zusammen aktivieren CD8-Killer-T-Zellen. Aktivierte CD8-Killer-T-Zellen lysieren Zellen, die Peptide intrazellulärer Erreger auf der Zelloberfläche präsentieren, und können so auch Viren und intrazelluläre Bakterien bekämpfen. CD4-Helfer-T-Zellen aktivieren außerdem B-Zellen, die daraufhin zu Plasmazellen differenzieren und große Mengen Antikörper sezernieren.

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität ist die adaptive Immunität antigenspezifisch. Es werden ausschließlich T- und B-Zellen aktiviert, die spezifisch auf Antigene des eingedrungenen Pathogens reagieren. Da nur wenige Zellen einer bestimmten Spezifität vorhanden sind, müssen die Zellen nach ihrer Aktivierung proliferieren, um eine ausreichend große Anzahl Effektorzellen zu erzeugen. Nach drei bis vier Tagen ist das adaptive Immunsystem einsatzbereit. Die Expansion spezifischer Effektorzellen ermöglicht jedoch eine maßgeschneiderte und daher sehr

effektive Bekämpfung des jeweiligen Pathogens. Fehlen essentielle Komponenten des adaptiven Immunsystems, sind schwere Immundefizienzen die Folge, die in der Regel einen raschen Tod nach sich ziehen. Nach der erfolgreichen Bekämpfung der Infektion sterben die meisten der expandierten Effektorzellen, einige jedoch differenzieren zu langlebigen Gedächtniszellen. Die Gedächtniszellen werden bei einer Reinfektion mit demselben Pathogen reaktiviert und führen zu einer schnelleren Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Die adaptive Immunantwort bildet ein immunologisches Gedächtnis.

Dendritische Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Wie in Abbildung 1.1 deutlich wird, befinden sich die dendritischen Zellen am Übergang von angeborener zu adaptiver Immunität. Auf Ebene der dendritischen Zellen entscheidet sich, ob und wie das adaptive Immunsystem aktiviert wird. Dendritische Zellen werden häufig als Wachtposten des Immunsystems bezeichnet. Sie finden sich in vielen Geweben und interstitiellen Räumen und sind daher bei einer Infektion sofort vor Ort (Banchereau et al. 2000). Wie Makrophagen und Granulozyten können sie als professionelle Phagozyten eindringende Bakterien aufnehmen und lysosomal verdauen. Die Aufnahme erfolgt wie bei den anderen Phagozyten über eine Vielzahl von Rezeptoren, zum Beispiel über Scavenger-Rezeptoren oder Komplement- und Fc-Rezeptoren, die opsonisierte Pathogene erkennen (Guermontprez et al. 2002). Kommt eine dendritische Zelle mit einem Erreger in Kontakt, wird sie aktiviert (Abb. 1.2). Die Phagozytosekapazität nimmt ab, während die Expression von MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekülen, die T-Zell-Antigene präsentieren, und die Expression von kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie zunehmen. Die dendritische Zelle verändert sich morphologisch und wandert schließlich zum Lymphknoten, um den dort zirkulierenden T-Zellen das aufgenommene Material zu präsentieren. Die Aktivierung der dendritischen Zelle kann sowohl durch die Erreger selbst als auch über andere bereits aktivierte Zellen des Immunsystems erfolgen (Abb. 1.2).

Im ersten Fall geschieht die Aktivierung oft über Toll-like-Rezeptoren (TLR). Im Menschen umfasst diese Proteinfamilie elf Mitglieder, in der Maus sind bisher 13 Toll-like-Rezeptoren beschrieben worden. Die Rezeptoren in der Maus sind den menschlichen Proteinen weitgehend homolog und reagieren bis auf wenige Ausnahmen auf dieselben Liganden. TLR 1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich in der äußeren Plasmamembran und erkennen pathogenassoziierte molekulare Muster auf Zellwänden von Bakterien wie Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure (Lta) oder Flagellin (Janeway 1989). TLR 3, 7, 8 und 9 befinden sich in intrazellulären Membra-

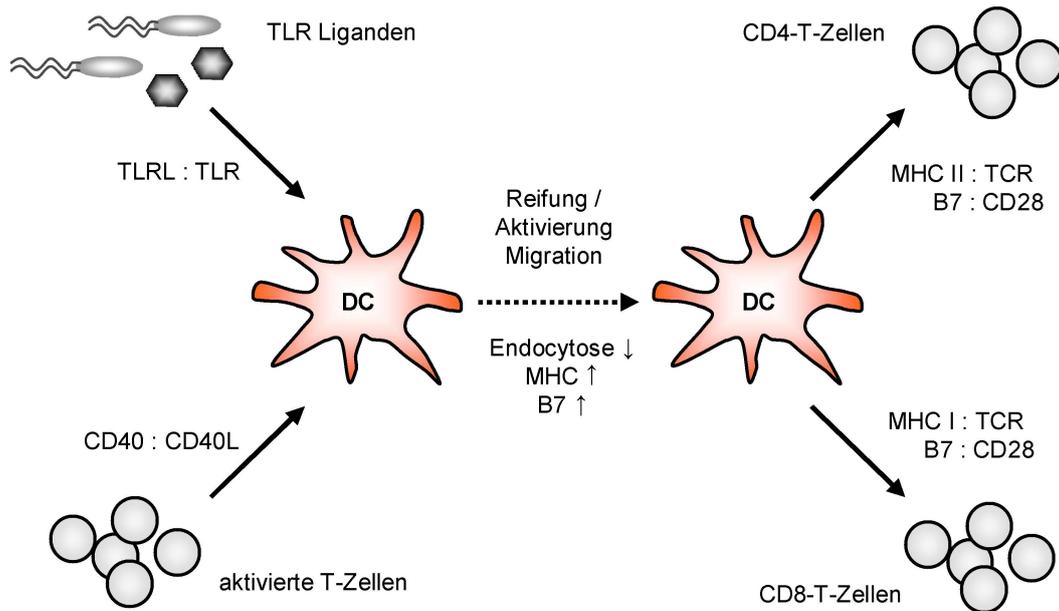


Abbildung 1.2: Aktivierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen werden entweder über Pathogene direkt oder über bereits aktivierte T-Zellen aktiviert. Im ersten Fall geschieht die Aktivierung oft über Toll-Like-Rezeptoren, im zweiten Fall über CD40L. Die dendritischen Zellen durchlaufen eine Reifung, während der sie die Phagozytose weitgehend einstellen und verstärkt MHC und kostimulatorische B7-Moleküle an die Oberfläche bringen. Sie wandern in den Lymphknoten und aktivieren dort antigenspezifische CD4- und CD8-T-Zellen.

nen und ragen mit der Rezeptordomäne ins Cytosol. Sie erkennen intrazelluläre Gefahrenmoleküle wie doppelsträngige virale RNA oder bakterielle CpG DNA-Sequenzen (Lasker & Nair 2006). Die Aktivierung der TLR führt in den dendritischen Zellen über die Aktivierung der Adapterproteine MyD88 und TRIF, die Interleukin-assoziierten Rezeptorkinasen 1 und 4 (IRAK1 und IRAK4) und die Kinase TRAF6 zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Kern (Übersicht in Kawai & Akira 2007). Neben der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle kommt es zur Synthese und Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF und IL-12 (Reis e Sousa 2004). Im zweiten Fall werden die dendritischen Zellen über CD40 aktiviert, einem Molekül der TNF-Rezeptor-Familie (Caux et al. 1994). Der Ligand CD40L wird von bereits zuvor aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Signaltransduktion über CD40 führt über eine MAP-Kinase-Kaskade ebenfalls zur Aktivierung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie TNF, IL-12 und IL-6, sowie zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle (Quezada et al. 2004, Bishop & Hostager 2001).

Dendritische Zellen gehören zusammen mit den Makrophagen und den B-Zellen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Wie alle körpereigenen Zellen besitzen die antigenpräsentierenden Zellen MHC-Moleküle der Klasse I, in denen sie intrazelluläre Peptide präsentieren. Der MHC I-Peptid-Komplex wird vom spezifischen T-Zell-

Rezeptor (TCR) und dem Korezeptor CD8 der T-Killerzellen erkannt und führt zum Beispiel bei Virusbefall zu einer Lyse der Zelle. APC besitzen zusätzlich zu den MHC I-Molekülen MHC-Moleküle der Klasse II, die Peptide aus Endosomen mit phagozytiertem Material präsentieren und mit dem spezifischen TCR und Korezeptor CD4 der T-Helferzellen interagieren. Die Peptide in den MHC II-Molekülen der APC spiegeln daher die Situation am Ort der Infektion wider. Während die Hauptaufgabe der Makrophagen die Beseitigung der Erreger durch Phagozytose ist, sind dendritische Zellen darauf spezialisiert, Material zu sammeln und es im Lymphknoten den T-Zellen zu präsentieren (Albert et al. 1998a). Im Gegensatz zu Makrophagen besitzen dendritische Zellen zudem die Fähigkeit, Peptide aus phagozytierten Proteinen aus dem Weg der MHC II-Präsentation in den MHC I-Präsentationsweg umzuleiten. Dieses Phänomen wird als Cross-Präsentation bezeichnet und ist für die Aktivierung der CD8-T-Zellen von entscheidender Bedeutung (Albert et al. 1998a und 1998b).

Ob der Kontakt mit dendritischen Zellen im Lymphknoten eine Aktivierung und damit eine Proliferation der T-Zellen auslöst, hängt von den Signalen ab, die die dendritische Zelle zur Verfügung stellt (Lutz & Schuler 2002). Eine T-Zell-Aktivierung findet nur statt, wenn zwei unabhängige Signale zusammenkommen. Signal 1 ist die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den spezifischen TCR. Signal 2 ist ein Kostimulus, der auf Seiten der dendritischen Zelle von den Molekülen der B7-Familie ausgeht (hauptsächlich CD80 und CD86). Rezeptoren für die B7-Moleküle auf Seiten der T-Zelle sind das aktivierende Molekül CD28 sowie das inhibitorische Molekül CTLA-4, das in einem späteren Stadium die Signalkaskade in den T-Zellen wieder abschaltet. Andere Faktoren wie das Cytokinmilieu können zusätzlich modulierend wirken und werden auch als Signal 3 bezeichnet (Greenwald et al. 2005, Corthay 2006). Ist Signal 2 abwesend oder nur unvollständig vorhanden, proliferieren die T-Zellen nicht oder erlangen keine Effektorfunktionen (Greenwald et al. 2005, Macian et al. 2004).

1.2 Zentrale und periphere immunologische Toleranz

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene zu bekämpfen und dabei dem eigenen Körper so wenig Schaden wie möglich zuzufügen. Durch klonale Selektion werden T- und B-Zellen selektiert, die keine Selbstantigene erkennen. Der Prozess ist aufwändig und mitunter fehleranfällig. Es bedarf daher auch nach der klonalen Selektion eines komplexen Systems, um die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem eigenen Gewebe aufrecht zu erhalten. In Bezug auf T-Zellen unterscheidet man zentrale Toleranz, die im Thymus erzeugt wird, und periphere Toleranz, deren

Prozesse in den anderen Geweben des Körpers ablaufen. Die Mechanismen der T-Zell-Toleranz sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Erzeugung von B-Zell-Toleranz läuft nach ähnlichen Prinzipien im Knochenmark und in der Peripherie ab (Goodnow et al. 1988, Wardemann et al. 2003).

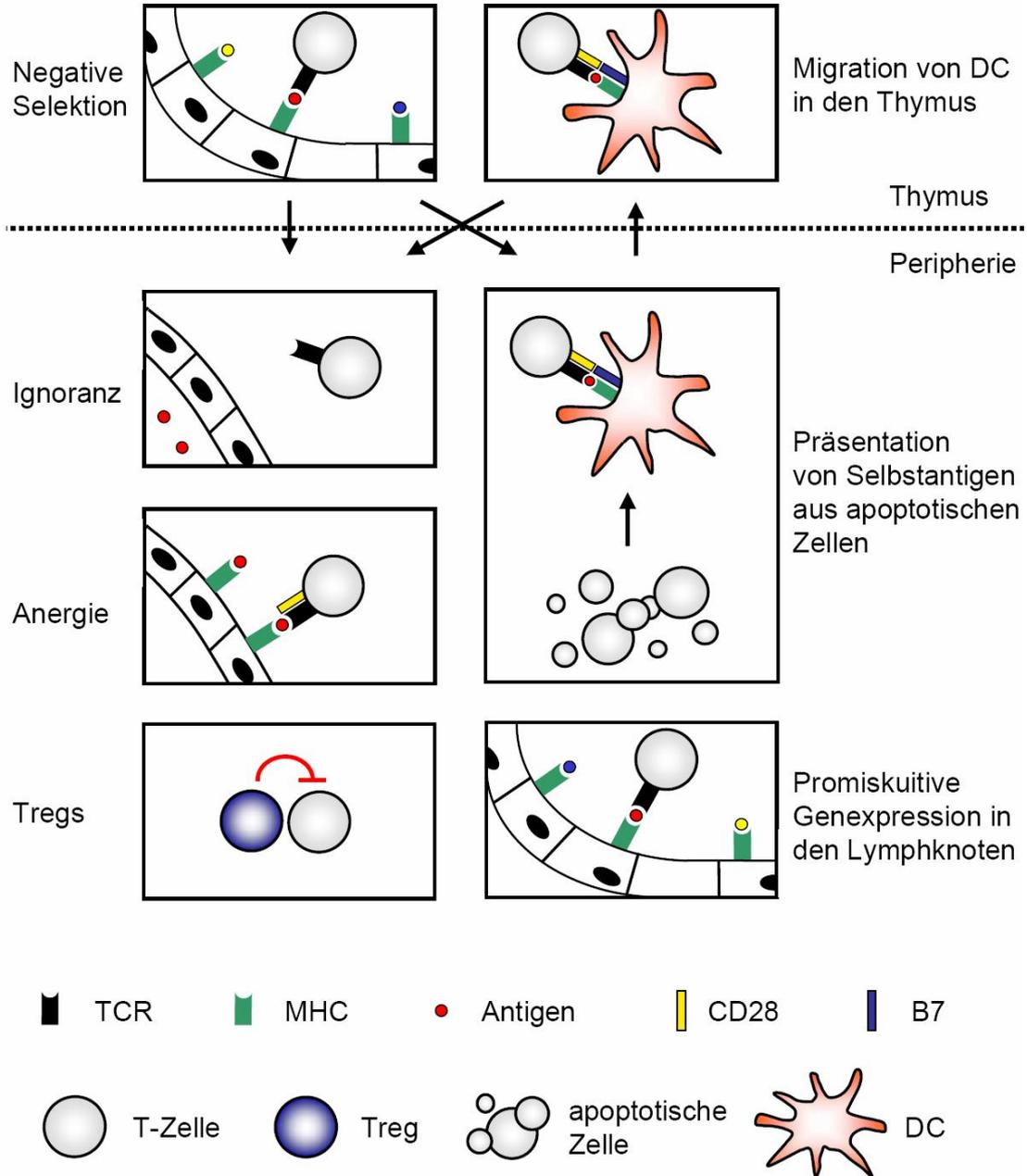


Abbildung 1.3: Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz verhindern eine Schädigung des Körpers durch autoreaktive T-Zellen.

Die negative Selektion im Thymus ist der wichtigste Mechanismus der zentralen Toleranz. In der Peripherie verhindern die Sequestrierung des Antigens (Ignoranz), die Induktion von Anergie sowie die Hemmung durch regulatorische T-Zellen (Treg) die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen. Eine weitere Möglichkeit der Toleranzinduktion ist die Präsentation apoptotischen körpereigenen Materials durch dendritische Zellen (DC) in einem Nicht-Gefahren-Kontext. Antigen-beladene dendritische Zellen können auch in den Thymus wandern und dort zentrale Toleranz gegenüber körpereigenen und körperfremden Antigenen auslösen. Kürzlich wurde zudem eine der negativen Selektion vergleichbare toleranzinduzierende promiskuitive Genexpression in den Lymphknoten nachgewiesen.

Zentrale Toleranz

Die zentrale T-Zell-Toleranz wird im Thymus erzeugt (Übersicht in Kyewski & Klein 2006). Jeden Tag wandern 10-100 Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus ein (Shortman et al. 1990). Dort vermehren sie sich und beginnen, jeweils einzigartige T-Zell-Rezeptoren zu exprimieren. Diese T-Zell-Rezeptoren haben eine genetisch bedingte Prädisposition für die Bindung an MHC-Moleküle. Dennoch gelingt es nur 5 % der Zellen, einen funktionalen T-Zell-Rezeptor zu exprimieren, der mit den MHC-Molekülen auf den Epithelzellen des Thymuscortex (cTEC) interagiert. Diese Zellen überleben (positive Selektion), während alle anderen Zellen sterben. Danach werden Zellen aussortiert, die später im Körper Autoimmunität auslösen könnten. Hierfür wandern die positiv selektierten Zellen vom Cortex in die Medulla, wo sie mit MHC-Molekülen auf residenten dendritischen Zellen und thymischen Epithelzellen (mTEC) interagieren (Palmer 2003). T-Zellen, die zu stark an die präsentierten körpereigenen Peptid-MHC-Komplexe binden, werden durch Apoptose eliminiert (negative Selektion).

In den Epithelzellen der Medulla ist die gewebe- und entwicklungspezifische Regulation der Genexpression teilweise aufgehoben (Derbinski et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor AIRE (Autoimmunregulator) ermöglicht in diesen Zellen die Expression vieler Proteine, die nur in bestimmten Geweben vorhanden sind oder nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung exprimiert werden (Anderson et al. 2002). Diese promiskuitive Genexpression ermöglicht es, auch gegen Proteine zentrale Toleranz zu erzeugen, die nicht für die Funktion der Thymuszellen benötigt werden. Man nahm lange an, dass zentrale Toleranz nur gegen im Thymus exprimierte Antigene erzeugt werden kann. Einer aktuellen Veröffentlichung zufolge kann zentrale Toleranz jedoch auch gegen Antigene aus der Peripherie erzeugt werden, die von dendritischen Zellen aus den Geweben in den Thymus transportiert werden (Bonasio et al. 2006). Die Autoren zeigen die thymische Präsentation von endogenen Antigenen aus dem Herzen, aber auch von exogenen löslichen Antigenen, die intravenös injiziert wurden.

Obwohl nur etwa 2 % der ursprünglich vorhandenen T-Zellen den Thymus als reife T-Zellen verlassen, enthält diese T-Zell-Population noch Zellen, die eine geringe Affinität für Autoantigene besitzen und damit potentiell autoreaktiv sind (Bouneaud et al. 2000). Um eine Aktivierung dieser Zellen in der Peripherie zu verhindern, existieren mehrere Mechanismen, T-Zellen auch nach dem Verlassen des Thymus zu inaktivieren oder zu eliminieren. Diese werden unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammengefasst.

Periphere Toleranz

Autoreaktive T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entgehen, durchlaufen bei ihrer Zirkulation durch den Körper verschiedene Kontrollpunkte der peripheren Toleranz. Einige T-Zellen erkennen ihr Antigen auf der Oberfläche körpereigener Zellen. Ein Signal über den T-Zell-Rezeptor ohne Kostimulation führt in diesem Fall zu einer Inaktivierung (Anergie, Greenwald et al. 2005, Macian et al. 2004). Dieser Mechanismus betrifft sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen.

Ein zweiter Mechanismus hält die Toleranz gegenüber intrazellulären Antigenen aufrecht. Jeden Tag sterben im Zuge der Gewebemöostase körpereigene Zellen und werden von umliegenden Zellen und professionellen Phagozyten aufgenommen ohne diese zu aktivieren. Huang et al. (2000) konnten zeigen, dass diese Zellen zum Lymphknoten wandern und dort zirkulierenden T-Zellen Selbstantigene aus den apoptotischen Zellen präsentieren. T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen in diesem Kontext binden, verlieren ihre Effektorfunktion. Von diesem Mechanismus der Toleranzinduktion sind in erster Instanz CD4-T-Zellen betroffen, die ihr Antigen im MHC II der dendritischen Zelle erkennen. Über Cross-Präsentation können Peptide jedoch auch in MHC I-Moleküle gelangen und auf diesem Weg auch CD8-T-Zellen tolerisieren (Kurts et al. 1997, Albert et al. 2001). Ob Toleranz ausgelöst wird, hängt vom Aktivierungszustand der dendritischen Zelle ab (Lutz & Schuler 2002). Welche Moleküle bei der Toleranzinduktion eine Rolle spielen, ist Gegenstand intensiver Forschung.

Viele autoreaktive T-Zellen kommen unter physiologischen Bedingungen jedoch gar nicht mit ihren Antigenen in Kontakt, da die meisten körpereigenen T-Zell-Epitope im Körper nur in geringen Mengen vorhanden bzw. für T-Zellen unzugänglich sind (immunologische Ignoranz, Kurts et al. 1999). Im Zuge einer Infektion kann es jedoch zu einer vermehrten Exposition dieser Antigene in einem pro-inflammatorischen Milieu kommen, so dass auch gegen sie Toleranz induziert werden muss (Ohashi et al. 1991, Voehringer et al. 2000). Eine kürzlich veröffentlichte Publikation zeigt in einem transgenen Maus-Modell, dass die Stromazellen des Lymphknotens MHC II-Moleküle besitzen und wie die Stromazellen des Thymus den Transkriptionsfaktor AIRE exprimieren. Dadurch weisen sie eine promiskuitive Expression gewebefremder Gene auf und können Toleranz gegenüber gewebefremden Proteinen erzeugen (Lee et al. 2007). Diese promiskuitive Genexpression in den Lymphknoten beträfe CD4- und CD8-T-Zell-Epitope gleichermaßen und könnte möglicherweise als dritter Mechanismus periphere Toleranz gegenüber unzugänglichen Autoantigenen erzeugen, die von den anderen Mechanismen der peripheren Toleranz nicht

abgedeckt werden. Die Ergebnisse von Lee et al. (2007) und der Nachweis, dass dendritische Zellen Antigene aus der Peripherie im Thymus präsentieren (Bonasio et al. 2006), lassen vermuten, dass die Funktionen von Thymus und Lymphknoten und damit die Induktion von zentraler und peripherer Toleranz ähnlicher sind als bisher angenommen.

Neben den Mechanismen der peripheren Toleranz, die darauf abzielen, autoreaktive T-Zellen bereits vor ihrer Aktivierung unschädlich zu machen, besteht die Möglichkeit, autoreaktiven T-Zellen auch nach ihrer Aktivierung abzuschalten und einen Angriff auf eigenes Gewebe zu verhindern. Dies ist die Aufgabe der Suppressor-T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen.

Regulatorische T-Zellen

Neben den konventionellen T-Zellen, die nach ihrer Aktivierung eine Immunantwort auslösen, gibt es Suppressor-T-Zellen, die nach ihrer Aktivierung konventionelle T-Zellen hemmen und so eine Immunantwort verhindern können (Übersicht in Bach 2003). Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen führt die Aktivierung bei Suppressor-T-Zellen nicht zu einer Proliferation; die Zellen sind anerg. Die wichtigste Population innerhalb der verschiedenen suppressiven Zellen stellen die natürlichen regulatorischen CD4-positiven T-Zellen dar, die sich neben der Expression von CD4 durch eine starke Expression von CD25 auf der Zelloberfläche auszeichnen, konstitutiv CTLA-4 exprimieren und den Transkriptionsfaktor Foxp3 besitzen (Übersicht in Sakaguchi 2004). Mäuse, die kein CTLA-4 oder kein FoxP3 besitzen oder in denen die natürlichen regulatorischen T-Zellen depletiert wurden, erliegen schon nach kurzer Zeit schweren Autoimmunerkrankungen (Waterhouse et al. 1995, Brunkow et al. 2001, Sakaguchi et al. 1995). Regulatorische T-Zellen besitzen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen eine hohe Affinität für Selbstpeptide und entstehen aus denjenigen Zellen, die im Thymus knapp der negativen Selektion entgehen (Sakaguchi et al. 2003). Während in Mäusen 5-10 % aller CD4-T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp aufweisen, umfasst die Population der humanen natürlichen regulatorischen T-Zellen nur 1-2 % der CD4-T-Zellen (Baecher-Allan 2001).

Der molekulare Mechanismus der Hemmung durch regulatorische T-Zellen ist bisher nicht geklärt. Während *in vitro* und in einigen *in vivo*-Modellen ein Zellkontakt zwischen regulatorischer und konventioneller T-Zelle erforderlich ist, wird die Hemmung in anderen *in vivo*-Modellen offenbar durch die Sekretion anti-inflammatorischer Cytokine wie TGF- β und IL-10 vermittelt (Übersicht in Wing et al. 2005). Bemerkenswert ist in jedem Fall, dass die Aktivierung der regulatorischen T-

Zellen antigenspezifisch über den T-Zell-Rezeptor erfolgt, die Antigenpezifität bei der anschließenden Hemmung der konventionellen T-Zellen jedoch keine Rolle mehr spielt (Thornton et al. 2000). Einmal aktiviert, können regulatorische T-Zellen eine polyklonale T-Zell-Aktivierung unterdrücken. Sie sind somit Träger dominanter Toleranz.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, andere T-Zellen zu hemmen, sind regulatorische T-Zellen in der Lage, die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie zu unterdrücken und so eine Reaktion gegen körpereigenes Gewebe zu verhindern. Diese Eigenschaft wirkt sich jedoch negativ auf die Fähigkeit des Immunsystems aus, Tumore zu bekämpfen (McHugh & Shevach 2002). So führt die Depletion regulatorischer T-Zellen in verschiedenen Tumormodellen zu Abstoßung oder verringertem Wachstum des Tumors (Onizuka et al. 1999, Shimizu et al. 1999).

Nicht alle zirkulierenden regulatorischen T-Zellen haben den Thymus bereits als regulatorische T-Zellen verlassen. Sowohl in der Maus als auch im Menschen konnte die Induktion regulatorischer T-Zellen in der Peripherie nachgewiesen werden (Akbari et al. 2001, Menges et al. 2002, McGuirk et al. 2002, Dhodapkar & Steinman 2002, Verhasselt et al. 2004). Ob diese Konversion konventioneller T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen auch unter physiologischen Bedingungen in nennenswertem Maß stattfindet, ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Debatte. Jonuleit et al. (2002) beobachteten, dass regulatorische T-Zellen nicht nur die Proliferation konventioneller T-Zellen unterbinden, sondern die Zellen auch zu sogenannten Tr1- oder Th3-Zellen differenzieren. Diese Zellen weisen ebenfalls einen regulatorischen Phänotyp auf und hemmen weitere konventionelle T-Zellen über die Sekretion von IL-10 (Tr1) und TGF- β (Tr1 und Th3). Dieses Phänomen wird als infektiöse Toleranz bezeichnet. Die Mechanismus der Konversion konventioneller T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen ist weitgehend ungeklärt, *in vivo* spielen neben dem Cytokinmilieu (TGF- β , Chen et al. 2001) antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle, da Mäuse, die keine B7-Moleküle besitzen, keine regulatorischen T-Zellen gegen periphere Antigene erzeugen können (Lohr et al. 2003). In den meisten experimentellen Modellen ist daher die Erzeugung peripherer regulatorischer T-Zellen eng mit dem Auftreten tolerogener dendritischer Zellen verknüpft.

Tolerogene dendritische Zellen

Dendritische Zellen nehmen Material in den peripheren Geweben auf, wandern in den Lymphknoten und präsentieren die aufgenommenen Antigene zirkulierenden T-Zellen. Ist das Herkunftsgewebe von einer Infektion betroffen, führt die Präsentation des pathogenen Materials zur Aktivierung spezifischer T-Zellen und zu einer

Immunantwort. Besteht das aufgenommene Material jedoch aus körpereigenem Gewebe, beispielsweise nach der Phagozytose körpereigener apoptotischer Zellen, kann die dendritische Zelle Toleranz induzieren. Erkennen autoreaktive T-Zellen ihr Antigen in diesem Kontext, verlieren sie ihre Effektorfunktion durch Anergie (Hawiger et al. 2001, Kawahata et al. 2002), deletierende Proliferation (Albert et al. 2001) oder die Konversion in regulatorische T-Zellen (Chen et al. 2003, Apostolou & von Boehmer 2004).

Was unterscheidet eine immunogene dendritische Zelle, die eine Immunantwort auslöst, von einer tolerogenen dendritischen Zelle, die Toleranz induziert? Zunächst nahm man an, der Reifegrad der dendritischen Zelle sei entscheidend und unreife dendritische Zellen induzierten Toleranz, während reife dendritische Zellen eine Immunantwort auslösten. Jonuleit et al. (2000) beobachteten im humanen System eine Induktion regulatorischer Zellen aus konventionellen Zellen nach längerer Kokultur mit unreifen dendritischen Zellen und Huang et al. (2000) wiesen die Wanderung mit Selbstantigenen beladener unreifer dendritischer Zellen in die Lymphknoten der Maus nach. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Reifung der dendritischen Zellen bis zu einem gewissen Grad nötig ist, um eine effiziente Prozessierung und Präsentation der Selbstantigene zu erreichen. Diese semi-reifen oder alternativ gereiften dendritischen Zellen zeichnen sich im Vergleich zu unreifen dendritischen Zellen durch eine erhöhte Expression von MHC II, CD80 und CD86 sowie eine erhöhte Sekretion des Cytokins IL-10 und die fehlende Sekretion von TNF und IL-12 aus (Lutz & Schuler 2002). Eine Konversion konventioneller naiver T-Zellen zu T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp wird *in vitro* und *in vivo* im Menschen unreifen oder semi-reifen dendritischen Zellen zugeschrieben (Lutz & Schuler 2002). Ein entscheidender Faktor für die Konversion ist offenbar die Abwesenheit proinflammatorischer Cytokine wie TNF und insbesondere IL-12. Das Cytokinmilieu als modulierendes Signal 3 der T-Zell-Aktivierung erlangt dadurch eine neue Bedeutung. In wie weit die *in vitro* mit Hilfe von Cytokinen generierten tolerogenen dendritischen Zellen den tolerogenen dendritischen Zellen *in vivo* entsprechen, ist nicht einfach festzustellen. Dass das Cytokinmilieu auch *in vivo* eine Rolle spielt, lässt sich jedoch daran ablesen, dass dendritische Zellen aus toleranzinduzierenden oder immunprivilegierten Geweben wie den Peyer'schen Plaques, der Lunge oder der vorderen Augenkammer ebenfalls IL-10 und kein IL-12 sezernieren und Tr1-Zellen induzieren können (Rutella et al. 2006, Akbari et al. 2001). Insgesamt konnte die Induktion von T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp in einer Vielzahl experimenteller Systeme gezeigt werden (Akbari et al. 2001, McGuirk et al. 2002, Menges et al. 2002, Faunce et al. 2004).

Umgekehrt können auch regulatorische T-Zellen aktiv tolerogene dendritische Zellen induzieren. In einem humanen *in vitro*-System differenzieren dendritische Zellen, die mit regulatorischen T-Zellen kokultiviert werden, zu tolerogenen dendritischen Zellen, die ihrerseits wieder in der Lage sind, Anergie in alloreaktiven CD4-T-Zellen auszulösen (Chang et al. 2002). In der Maus sind regulatorische T-Zellen in der Lage, in dendritischen Zellen die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und damit einen tolerogenen Phänotyp erzeugen (Fallarino et al. 2003). Als Hüter der peripheren T-Zell-Toleranz kooperieren tolerogene dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen eng miteinander.

1.3 Apoptose

Während in einzelligen Lebewesen der Tod der Zelle mit dem Tod des Organismus identisch ist, besteht bei mehrzelligen Lebewesen ein stetiges Gleichgewicht zwischen entstehenden und sterbenden Zellen. Der kontrollierte Zelltod ermöglicht die Entsorgung von beschädigten oder nicht mehr benötigten Zellen und ist für die Entwicklung und Gewebemöostase unentbehrlich. Die erste morphologische Beschreibung des kontrollierten Zelltods stammt von Carl Vogt und wurde bereits im Jahre 1842 publiziert (Vogt 1842). 130 Jahre später formulierten die schottischen Pathologen John F.R. Kerr, Alaistair R. Currie und Andrew H. Wyllie das Konzept des kontrollierten Zelltods (Kerr et al. 1972, Wyllie et al. 1980). Sie erkannten die grundlegende Bedeutung des programmierten Zelltods als Gegengewicht zur kontrollierten Zellteilung und der zellulären Erneuerung und prägten den Begriff Apoptose (griechisch: das Herabfallen, zum Beispiel der Blätter im Herbst).

Kennzeichen und Verlauf der Apoptose

Im Mikroskop ist der programmierte Zelltod an charakteristischen morphologischen Veränderungen zu erkennen: Die Zelle schrumpft, der Kern zerfällt, Teile der Membran stülpen sich zu Bläschen aus (Zeiose) und schnüren sich schließlich als membranumschlossene apoptotische Vesikel ab. Die Reste der sterbenden Zellen werden in der Regel vom umliegenden Gewebe oder professionellen Phagozyten aufgenommen, bevor die Membran der apoptotischen Körperchen sich auflöst und cytosolische Bestandteile der sterbenden Zelle in den extrazellulären Raum gelangen. Die Entsorgung geschieht immunologisch unauffällig (Savill et al. 1993).

Auf molekularer Ebene bezeichnet der Begriff Apoptose ein Programm von Molekülinteraktionen, das ausgehend von unterschiedlichen Stimuli über verschiedene Wege geordnet und nach festen Schemata abläuft und schließlich zum Tod der Zelle führt. Die apoptoseauslösenden Signale können von anderen Zellen

stammen (extrinsischer Weg) und beispielsweise über den Todesrezeptor CD95 vermittelt werden (Peter & Kramer 2003) oder im Inneren der Zelle ausgelöst werden (intrinsischer Weg), zum Beispiel nach starker Schädigung der DNA durch genotoxische Substanzen oder UV-Strahlung (Rich et al. 2000). In beiden Fällen werden Caspasen aktiviert, proteolytische Enzyme, die in der Zelle als Proenzyme vorliegen. Man unterscheidet Initiator-Caspasen, die in einer proteolytischen Kaskade weitere Caspasen aktivieren, und Effektor-Caspasen, die Strukturproteine, Komponenten der Signaltransduktionswege und regulatorische Proteine des Zellzyklus spalten (Fischer et al. 2003). Im weiteren Verlauf der Apoptose wird die Mitochondrienmembran depolarisiert und die Energieversorgung der Zelle bricht zusammen. Die Aktivierung von DNasen führt zudem zu einer für die Apoptose charakteristischen Spaltung der DNA zwischen den Nucleosomen (Wyllie et al. 1980). Ob ein Stimulus zum Tod der Zelle führt, hängt von der Stärke des Signals und der Sensitivität der Zelle ab. Zum einen können die Moleküle der apoptotischen Signaltransduktion in verschiedenen Zellen unterschiedlich stark exprimiert sein, zum anderen beeinflussen verschiedene pro- und anti-apoptotische Moleküle sowohl die Signaltransduktion als auch die Anfälligkeit der Mitochondrienmembran gegenüber Depolarisierung. Die Sensitivität gegenüber einem apoptotischen Stimulus kann daher je nach Typ, Differenzierungsgrad und Aktivierungsstatus der Zelle stark unterschiedlich sein (Arnold et al. 2006).

Nicht immer steht genügend Zeit zur Verfügung, um das apoptotische Programm vollständig zu durchlaufen. Dies ist insbesondere in akuten Mangelsituationen wie Hypoxie, Hyperthermie und bei mechanischer Beschädigung der Zellmembran der Fall. Die Zelle schwillt an, da kein osmotischer Ausgleich mehr stattfindet, die Membran reißt, und der Zellinhalt gelangt in den Extrazellularraum. Dieser Vorgang wird als Nekrose (griechisch nekros: tot) bezeichnet (Kerr et al. 1972, Okada & Mak 2004). Einige intrazelluläre Moleküle wie zum Beispiel Hitzeschockproteine und Harnsäure wirken im Extrazellularraum als endogene Gefahrensignale und lösen eine Aktivierung des Immunsystems aus (Shi et al. 2003, Binder et al. 2000). Dies ist zum Beispiel dann vorteilhaft für den Organismus, wenn die Zelle von lytischen Viren zerstört wurde. Auch bei apoptotischen Zellen wird die Membranintegrität nicht unbegrenzt aufrechterhalten. Werden die sterbenden Zellen nicht phagozytiert, gelangen nach einiger Zeit ebenfalls cytosolische Proteine in den Extrazellularraum. Dieser Vorgang wird als sekundäre Nekrose bezeichnet (Wyllie et al. 1980).

Phagocytose apoptotischer Zellen

Apoptotische Zellen werden in der Regel zügig von den Zellen in ihrer Umgebung und

Als „*Eat-me*“-Signale treten verschiedene Gruppen von Molekülen in Erscheinung. Eines der frühesten und wichtigsten Signale ist die Exposition von Phosphatidylserin im äußeren Membranblatt der apoptotischen Zelle (Fadok et al. 1992, Martin et al. 1995). Das negativ geladene Lipid befindet sich in lebenden Zellen im inneren Blatt der Plasmamembran. Im Verlauf der Apoptose gelangt es durch zwei unabhängige Mechanismen auf die Zelloberfläche. Zum einen wird die Translocase in der Plasmamembran abgeschaltet, die in der lebenden Zelle nach außen diffundierte negativ geladene Lipide zurück ins innere Membranblatt transportiert (Tang et al. 1996, Verhoven et al. 1995). Zum anderen wird eine Scramblase aktiviert, die die Lipide beider Membranblätter aktiv durchmischt (Williamson et al. 1992, Verhoven et al. 1995). Auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle dient Phosphatidylserin sowohl als „*Eat-me*“-Signal als auch als Ankerstelle für eine Reihe von Adapterproteinen, die entweder von der apoptotischen Zelle exponiert werden wie Annexin 1, vom Phagozyten stammen wie MFG-E8 oder bereits im Serum vorhanden sind wie Gas6, β 2-GPI oder Protein S (Arur et al. 2003, Hanayama et al. 2002, Chen et al. 1997, Balasubramanian & Schroit 1998, Anderson et al. 2003). Die Adapterproteine werden von Rezeptoren auf der phagozytierenden Zelle erkannt. MFG-E8 bindet an den Vitronectin-Rezeptor, Gas6 an die Mer-Tyrosin-Kinase und β 2-GPI an den β 2-GPI-Rezeptor. Die Rezeptoren für Annexin 1 und Protein S sind bisher nicht bekannt. Phosphatidylserin wird auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle oxidiert (Kagan et al. 2002). Der Einfluss dieser Modifikation auf die Phagozytose ist noch nicht geklärt, MFG-E8 weist jedoch eine höhere Affinität für die oxidierte Form von Phosphatidylserin auf (Borisenko et al. 2004).

Als Rezeptor für Phosphatidylserin selbst wurde auf Seiten der phagozytierenden Zelle der Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) beschrieben (Fadok et al. 2000). Die Daten werden jedoch kontrovers diskutiert, da nur zwei von drei unabhängig erzeugten Knockout-Mäusen Defekte in der Phagozytose apoptotischer Zellen aufweisen (Li et al. 2003, Kunisaki et al. 2004, Bose et al. 2004). In der Studie von Bose et al. (2004) reagierte der Antikörper, der zur Identifizierung des PSR in einem *Phage-Display*-Experiment geführt hatte, zudem mit der Oberfläche PSR-defizienter Zellen. In weiteren Studien wurde für das PSR-Protein eine Lokalisation im Nucleus nachgewiesen (Mitchell et al. 2006, Cui et al. 2004, Cikala et al. 2004). Diese Experimente deuten darauf hin, dass es sich bei dem identifizierten Molekül nicht um den gesuchten membranständigen Rezeptor handelt.

Während Phosphatidylserin und Annexin 1 in lebendigen Zellen im Inneren der Zelle zu finden sind und nach Translokation auf der äußeren Seite der Plasmamembran als Signal zur Verfügung stehen, entstehen andere Interaktionen zwischen apoptotischer

Zelle und Phagozyt durch Modifikation bereits auf der Zelloberfläche vorhandener Moleküle. CD31 verwandelt sich durch eine veränderte Signaltransduktion von einem „Don't-eat-me“-Signal in ein „Eat-me“-Signal und das modifizierte Integrin ICAM3 bindet an CD14, das in diesem Zusammenhang kein pro-inflammatorisches Signal an den Phagozyten weiterleitet (Savill 1998). Die Bedeutung von modifizierten Zuckerstrukturen auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle ist noch nicht abschließend geklärt (Eda et al. 2004, Azuma et al. 2002, Beaver & Stoneman 1999).

Weitere „Eat-me“-Signale sind bisher wenig charakterisiert; ihre Existenz wird vor allem aufgrund der Beteiligung verschiedener Rezeptorsysteme auf Seiten des Phagozyten postuliert. So existieren Bindungsstellen, die oxidierten LDL-Partikeln des Lipidstoffwechsels ähneln und von der Familie der Scavenger-Rezeptoren (SR-A, LOX1, CD68 und CD36) erkannt werden (Erdosova et al. 2002, Oka et al. 1998, Platt et al. 1996, Ren et al. 1995). Als ein mögliches Molekül auf Seite der apoptotischen Zelle wird in diesem Zusammenhang Lysophosphatidylcholin diskutiert (Lauber 2003). Der Scavenger-Rezeptor CD36 bindet zudem ebenso wie der Vitronectin-Rezeptor das Adaptermolekül Thrombospondin (Savill et al. 1992), dessen Ankerstelle auf der apoptotischen Zelle bisher nicht bekannt ist. Zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Apoptose kann die Bindung von C1q und MBL an die apoptotische Zelle beobachtet werden (Nauta et al. 2002, Nauta et al. 2003). Die Bindung führt jedoch nicht zu einer Lyse der apoptotischen Zelle durch Komplement, da die Anwesenheit von CRP die weitere Anlagerung von Proteinen der Komplementkaskade verhindert (Suankratay 1998). Diese Komponenten des Komplementsystems werden auf Seiten der phagozytierenden Zelle vom CD91-Calreticulin-Komplex erkannt (Vandivier et al. 2002). Noch später im Verlauf der Apoptose binden auch die Komplement-Proteine C3 und C4 (Takizawa et al. 1996, Mevorach et al. 1998) an die Rezeptoren CR3 und CR4 auf dem Phagozyten. In diesem Stadium kann die Zelle auch von IgM-Antikörpern opsoniert werden (Kim et al. 2003), die von Fc-Rezeptoren erkannt werden. Während ein Fehlen vieler der genannten Adaptermoleküle mit einer defekten Aufnahme apoptotischer Zellen verbunden ist, führt das Blocken oder die Deletion der CR3- und CR4-Rezeptoren nicht zu einem Phagozytose-Defekt (Savill et al. 1989, Ren et al. 2001). Die Rezeptoren CR3 und CR4 sind daher im physiologischen Kontext offenbar für die Aufnahme apoptotischer Zellen entbehrlich. Daten von Skoberne et al. (2006) weisen jedoch darauf hin, dass die Rezeptoren für die Übermittlung eines anti-inflammatorischen Signals von Bedeutung sein könnten.

Im Gegensatz zur Aufnahme apoptotischer Zellen ist die Aufnahme nekrotischer Zellen wenig erforscht. Phosphatidylserin und Annexin 1 gelangen passiv auch in nekrotischen Zellen an die Zelloberfläche. Böttcher et al. (2006) zeigen, dass auch

CD36, der Vitronectin-Rezeptor, CD14 und C1q bei der Aufnahme nekrotischer Zellen beteiligt sind. C3, C4, CRP und Thrombospondin wurden ebenfalls auf der Oberfläche nekrotischer Zellen beschrieben (Ciurana et al. 2004, Hart et al. 2005, Hart et al. 2000). Es ist anzunehmen, dass die Aufnahme nekrotischer Zellen durch ähnliche Systeme erfolgt wie die Aufnahme apoptotischer Zellen. Ein Hauptunterschied ist vermutlich die fehlende Membranintegrität nekrotischer Zellen, die zur zusätzlichen Ausschüttung intrazellulärer Gefahrensignale wie ATP, Harnsäure, Hitzeschock-Proteinen und des DNA-bindenden Proteins HMGB1 führt (Hanley et al. 2004, Shi et al. 2003, Binder et al. 2000, Scaffidi et al. 2002).

Neben der Aufnahme apoptotischer und nekrotischer Zellen sind die Phagozyten auch auf die Aufnahme von Pathogenen wie Bakterien spezialisiert (Übersicht in Henneke & Golenbock 2004). Die Aufnahme geschieht in diesem Fall hauptsächlich über Opsonisierung der Pathogene durch Antikörper und Komponenten des Komplementsystems, die auf Seiten der phagozytierenden Zellen von Fc-Rezeptoren und den Komplementrezeptoren CR3 und CR4 erkannt werden. Die Aufnahme geht mit der Aktivierung der Phagozyten durch Toll-like-Rezeptoren und Proteine mit nucleotidbindenden Oligomerisationsdomänen (NOD) einher, die konservierte Strukturen der Pathogene wie LPS und Flagellin bzw. Peptidoglycan-Fragmente erkennen (Picard et al. 2003, Takeuchi et al. 2000, Girardin et al. 2003). Auch wenn die Aufnahme von Pathogenen zum Teil über dieselben Wege erfolgt wie die Aufnahme körpereigener sterbender Zellen, unterscheidet sich der immunologische Kontext deutlich. Im Gegensatz zur Aufnahme apoptotischer Zellen findet die Aufnahme von Pathogenen in Gegenwart von Gefahrensignalen und in einem pro-inflammatorischen Cytokinmilieu statt. Blander und Medzhitov (2004) beobachten zudem eine Aufnahme von Bakterien und apoptotischen Zellen in unterschiedliche Kompartimente.

Die beschriebenen Systeme für die Aufnahme apoptotischer Zellen sind teilweise redundant. So können Antikörper gegen einzelne Komponenten die Phagozytose apoptotischer Zellen nur teilweise blocken (Verbovetski et al. 2002, Devitt et al. 1998, Mofatt et al. 1999, Chang et al. 1999, Ogden et al. 2001). Allerdings kann bereits das Fehlen eines einzelnen Moleküls die Phagozytose erheblich vermindern und zu Autoimmunerkrankungen führen. Mäuse, denen Mer, MFG-E8, C1q, CD14 oder MBL fehlen, weisen eine verringerte Phagozytose apoptotischer Zellen auf (Cohen et al. 2002, Hanayama et al. 2004, Mitchell et al. 2002, Devitt et al. 2004, Stuart et al. 2005). Die Vielfalt der „Eat-me“-Signale zeigt, dass es sich bei der Aufnahme apoptotischer Zellen um ein wichtiges System handelt, das durch mehrere Instanzen gesichert ist. Doch selbst diese Redundanz ist offenbar nicht ausreichend, die

Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen bei Störungen des Systems zu verhindern.

Die Entsorgung apoptotischer Zellen ist kein immunologisches Null-Ereignis, wie lange angenommen wurde. Apoptotische Zellen üben aktiven Einfluss auf die sie aufnehmenden Phagozyten aus und tragen so zu einer adäquaten Antwort des Immunsystems auf die jeweilige Situation bei.

1.4 Der Einfluss apoptotischer Zellen auf das Immunsystem

Apoptotische Zellen enthalten Selbstantigene, auch solche, gegen die im Thymus keine zentrale Toleranz erzeugt wurde. Die Entsorgung apoptotischer Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen birgt daher stets die Gefahr der Autoimmunität. Die Forschung der letzten 15 Jahre hat gezeigt, dass apoptotische Zellen nicht nur aktiv an ihrer eigenen Entsorgung beteiligt sind, sondern auch Einfluss auf die weitere Verwendung der in ihnen enthaltenen Selbstantigene nehmen. Der Vergleich der experimentellen Ergebnisse ist nicht einfach, da verschiedene Gruppen unterschiedliche primäre oder *in vitro* differenzierte Phagozyten verwenden, auf unterschiedliche Weise Apoptose induzieren und die Begriffe frühapoptotisch, spätapoptotisch und nekrotisch unterschiedlich voneinander abgrenzen. Daher kommt *in vivo*-Experimenten in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu.

Nach vorherrschender Meinung ist die Entsorgung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen in der Regel nicht mit einer Aktivierung der Phagozyten verbunden, sondern führt vielmehr nach LPS-Stimulus zu einer verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF, IL-12 und IL-6 und einer erhöhten Sekretion anti-inflammatorischer Cytokine wie TGF- β und IL-10 (Voll et al. 1997, Kim et al. 2004, Byrne & Reen 2002, Fadok et al. 1998). Zudem wurde eine verminderte Expression von kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie beschrieben (Ip & Lau 2004, Stuart et al. 2002). Einige Gruppen beobachteten die Sekretion anti-inflammatorischer Cytokine durch die apoptotischen Zellen selbst: Gao et al. (1998) die Sekretion von IL-10 bei sterbenden Lymphocyten und Chen et al. (2001) die Sekretion von TGF- β bei apoptotischen Thymocyten. Das von Makrophagen und apoptotischen Zellen sezernierte TGF- β führt möglicherweise zu einem anti-inflammatorischen Milieu, das die tolerogene Aufnahme von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen begünstigt (Savill et al. 2002). Die sezernierten Cytokine sind für einen anti-inflammatorischen Effekt auf die Phagozyten offenbar nicht ausreichend, da die Inhibition durch Zellkontakt mit der apoptotischen Zelle erfolgt und nicht von löslichen Faktoren abhängt (Cvetanovic & Ucker 2004, Weyd

2005). Welche Moleküle auf Seiten der apoptotischen Zelle anti-inflammatorische Signale in das Innere des Phagozyten vermitteln, ist weitgehend ungeklärt. Als anti-inflammatorisches Signal auf apoptotischen Zellen wurde Phosphatidylserin beschrieben, allerdings wird der Rezeptor kontrovers diskutiert (Krysko et al. 2006). Mäuse, deren Phagozyten kein MFG-E8 sezernieren, besitzen Autoantikörper im Serum (Hanayama 2004). Fehlen den Phagozyten die Rezeptoren der Mer-Tyrosin-Kinase-Familie, entwickeln die Mäuse eine Autoimmunkrankheit, die dem humanen Systemischen Lupus Erythematosus gleicht (Sen et al. 2007). In allen drei Fällen treten jedoch ebenfalls Phagozytosedefekte auf, so dass nicht klar ist, ob es sich um das Fehlen eines anti-inflammatorischen Signal handelt oder um das vermehrte Auftreten pro-inflammatorischer Signale durch eine verspätete oder unzureichende Aufnahme der apoptotischen Zellen. *In vivo*-Experimente bestätigen die *in vitro* gewonnenen Daten. So beobachteten Huyn et al. (2004) einen hauptsächlich über TGF- β vermittelten Rückgang entzündlicher Läsionen in der Lunge LPS-stimulierter Mäuse nach direkter Injektion apoptotischer Zellen in die Läsionen. Duffield et al. (2001) zeigen, dass sogar mit IFN- γ aktivierte Makrophagen durch die Aufnahme apoptotischer Zellen inhibiert werden können. Ferguson et al. (2002) induzieren spezifische Toleranz durch die Injektion antigengekoppelter apoptotischer Milzzellen und Hugues et al. (2002) verhindern den Ausbruch von Diabetes durch gezieltes Auslösen einer begrenzten Apoptose in den β -Zellen des Pankreas.

Einige Publikationen beschreiben jedoch einen pro-inflammatorischen Effekt apoptotischer Zellen. Lorimore et al. (2001) zeigen, dass durch Bestrahlung in der Milz ausgelöste Apoptose eine pro-inflammatorische Reaktion von Makrophagen nach sich ziehen kann. Savill et al. (2002) beobachten, dass LPS-behandelte Makrophagen in den ersten zwei Stunden nach Aufnahme apoptotischer Zellen zunächst verstärkt TNF sezernieren, dann jedoch die TNF-Sekretion reduzieren und vermehrt TGF- β ausschütten. Die Autoren spekulieren, dass eine anfängliche pro-inflammatorische Reaktion dazu dienen könnte, zunächst eine ausreichende Anzahl Phagozyten anzulocken, um das apoptotische Material schließlich zügig und in einem letztendlich anti-inflammatorischen Milieu zu entsorgen.

Während die Aufnahme apoptotischer Zellen zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase in einem Nicht-Gefahren-Kontext in der Regel zu einer anti-inflammatorischen Antwort führt, werden die Phagozyten durch die Aufnahme apoptotischer Zellen im Kontext einer Infektion aktiviert. So führt die Aufnahme virusinfizierter apoptotischer Zellen durch die gleichzeitige Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren zu einer pro-inflammatorischen Antwort (Restifo et al. 2000) und dendritische Zellen sind in der Lage, nach Aufnahme von apoptotischen Influenza-

infizierten Monocyten virusspezifische CD8-T-Zellen zu aktivieren (Albert et al. 1998b). Auch wenn die apoptotischen Zellen intrazelluläre Bakterien enthalten, kommt es zu einer pro-inflammatorischen Antwort der Phagozyten (Zheng et al. 2004). Blander und Medzhitov (2006) beobachteten im Fall einer gleichzeitigen Aufnahme von apoptotischen Zellen und Bakterien, dass die dendritischen Zellen bevorzugt Antigene aus Phagosomen präsentieren, die gleichzeitig TLR-Liganden enthalten. Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, dass möglichst wenige Autoantigene in einem Gefahren-Kontext präsentiert werden, selbst wenn apoptotische Zellen im pro-inflammatorischen Milieu einer Infektion aufgenommen werden.

In einem anderen Kontext ist eine Immunantwort gegen apoptotische Zellen sogar erwünscht: bei der Tumorstimmung (Banchereau & Palucka 2005). Bei der Tumorstimmung werden in der Regel Tumorzellen entnommen und es wird *in vitro* Apoptose ausgelöst. Patienteneigene dendritische Zellen phagozytieren *in vitro* die apoptotischen Tumorzellen in Gegenwart von LPS und werden zurück in den Patienten injiziert, um in den Lymphknoten eine Immunantwort gegenüber dem Tumor auszulösen. Die Reifung der dendritischen Zellen durch hohe LPS-Konzentrationen ist in diesem Protokoll von entscheidender Bedeutung, da hierdurch die Toleranz gegenüber den apoptotischen Zellen gebrochen und im Körper die Präsentation der Tumorantigene in einem Gefahrenkontext ermöglicht wird. Wird die Apoptose des Tumors durch Chemotherapeutika in Abwesenheit von LPS *in vivo* induziert, besteht jedoch die Gefahr, systemische Toleranz gegen den Tumor auszulösen (Zitvogel et al. 2004). Ziel einer apoptoseinduzierenden Chemotherapie muss daher ein besonders immunogener Tod der Tumorzellen sein. Einige Studien zeigen, dass der durch verschiedene Chemotherapeutika ausgelöste Tod von Tumorzellen unterschiedlich stark immunogen sein kann (Casares et al. 2005, Obeid et al. 2007). In einer der Veröffentlichungen wird die frühe Exposition von Calreticulin auf den sterbenden Tumorzellen durch einige der Chemotherapeutika mit einem immunogenen Tod in Verbindung gebracht (Obeid et al. 2007).

Über die Auswirkungen spätapoptotischer und nekrotischer Zellen auf das Immunsystem gehen die Meinungen noch weiter auseinander als bei frühapoptotischen Zellen. Viele Gruppen erachten sowohl spätapoptotische als auch nekrotische Zellen als pro-inflammatorisch (Cohen et al. 2002, Sauter 2000, Ip & Lau 2004). Einige Gruppen vertreten jedoch die Ansicht, dass spätapoptotische Zellen zu einer anti-inflammatorischen Antwort führen, während nekrotische Zellen pro-inflammatorisch wirken (Ren et al. 2001, Cocco & Ucker 2001). Die Autoren erklären Unterschiede zwischen spätapoptotischen und nekrotischen Zellen dadurch, dass während der Apoptose zum Beispiel durch Caspasen gespaltene Moleküle auftreten,

die im Fall von nekrotischen Zellen nicht vorliegen. Wenige Gruppen beobachten sogar für nekrotische Zellen einen nicht-inflammatorischen Effekt (Hirt & Leist 2003, Brouckaert et al. 2004).

Letztendlich beeinflussen wohl viele verschiedene Faktoren die Wirkung apoptotischer und nekrotischer Zellen auf das Immunsystem. Abgesehen von unterschiedlichen Arten des Zelltods (apoptotisch vs. nekrotisch) und verschiedenen Kontexten (Gewebehomöostase vs. Infektion, anti-inflammatorisches vs. pro-inflammatorisches Milieu) wird auch die Aufnahme durch unterschiedliche Phagozyten diskutiert. In der Maus sind vor allem CD8 α -positive dendritische Zellen für die Aufnahme von apoptotischen Zellen verantwortlich (Iyoda 2002, Schulz & Reis e Sousa 2002), während im Menschen diese Aufgabe hauptsächlich von unreifen, aus Monocyten differenzierten dendritischen Zellen übernommen wird (Daalgaard 2005). Auch bei Makrophagen gibt es funktionelle Unterschiede zwischen verschiedenen Untergruppen. Makrophagen werden sowohl in der Maus als auch im Menschen in zwei Subtypen unterteilt: klassisch durch IFN- γ aktivierte und alternativ durch IL-4 und IL-13 aktivierte Makrophagen (Gordon 2003, Mosser 2003). Während klassisch aktivierte Makrophagen in der Regel mit einer pro-inflammatorischen Antwort in Verbindung gebracht werden, gelten alternativ aktivierte Makrophagen als anti-inflammatorisch. Xu et al. (2006) konnten zeigen, dass apoptotische Zellen vornehmlich von alternativ aktivierten Makrophagen aufgenommen werden.

Während Makrophagen phagozytirtes Material schnell abbauen (Delamarre et al. 2005), sind dendritische Zellen in der Lage, Antigene für mindestens zwei Tage vor dem Abbau zu bewahren und während dieser Zeit in MHC-Molekülen zu präsentieren (Inaba 2000). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass dies auch mit Antigenen apoptotischer Zellen geschieht (Schulz & Reis e Sousa 2002, Li 2001, Scheffer 2003), und die dendritischen Zellen auch im unreifen Zustand zum Lymphknoten migrieren und dort T-Zellen apoptotisches Material präsentieren (Huang et al. 2000, Steinman et al. 2000). Huang et al. (2000) und Nakamura et al. (1999) beschreiben die Tolerisierung von CD4-T-Zellen durch dendritische Zellen mit Hilfe von apoptotischem Material, Albert et al. (2001) auch die Tolerisierung von CD8-T-Zellen. Je nach Modell werden die T-Zellen anerg oder deletiert (Huang et al. 2000, Nakamura et al. 1999). Diese Entdeckung ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Entsorgung apoptotischer Zellen. Die Präsentation apoptotischen Materials im Lymphknoten zeigt, dass es sich bei der Phagozytose apoptotischer Zellen nicht nur um eine möglichst reibungslose und immunologisch unauffällige Entsorgung handelt. Vielmehr sind dendritische Zellen mit Hilfe der Antigene aus apoptotischen Zellen in der Lage, potentiell autoreaktive Zellen in der Peripherie zu eliminieren (Liu et al.

2002, Albert et al. 2001).

Sind bei der Phagozytose beteiligte Moleküle defekt, kann es zu Autoimmunität kommen. Mäuse, die defizient sind für das Komplementprotein C1q, die Tyrosinkinase Mer oder das Adapterprotein MFG-E8, weisen je nach genetischem Hintergrund Autoimmunerkrankungen auf (Cohen et al. 2002, Hanayama et al. 2004, Mitchell et al. 2002). Auch beim Menschen erhöht ein defektes C1q-Protein das Risiko, an der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematosus (SLE) zu erkranken (Petty 1998). Der Systemische Lupus Erythematosus ist eine komplexe heterogene Autoimmunerkrankung, die durch das vermehrte Auftreten apoptotischer Keratinocyten in der Haut und eine systemische Immunreaktion gegen Autoantigene aus diesen sterbenden Zellen gekennzeichnet ist (Hermann et al. 1998, Übersicht in Fairhurst et al. 2006). Die Aufnahme der apoptotischen Zellen führt offenbar statt zu einer immunologisch unauffälligen oder vorteilhaften Entsorgung zu einem Bruch der Toleranz gegenüber apoptotischen Antigenen (Casciola-Rosen 1994, Rosen & Casciola-Rosen 1999, Voll et al. 1997). Einige SLE-Patienten weisen neben den typischerweise auftretenden Antikörpern gegen doppelsträngige DNA und verschiedene nukleäre Antigene zudem Antikörper gegen Moleküle auf, die bei der Interaktion von Phagozyt und apoptotischer Zelle eine Rolle spielen, wie zum Beispiel C1q, Phospholipide und Annexin 1.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen im Zuge der Gewebemöostase in einem Nicht-Gefahren-Kontext anti-inflammatorisch ist und zur Eliminierung potentiell autoreaktiver T-Zellen führen kann.

1.5 Annexin 1 als anti-inflammatorisches Molekül

Die Annexine bilden eine evolutionär konservierte Familie calcium- und lipidbindender Proteine. Bisher wurden über 160 Annexine in mehr als 65 Spezies beschrieben, in Tieren Pflanzen, Pilzen und Protisten, jedoch bisher nicht in Prokaryoten und Hefen (Benz & Hoffmann 1997, Morgan & Fernandez 1997). In Wirbeltieren sind 12 verschiedene Annexine bekannt, die durch Gen-Duplikation entstanden sind (Annexin A1-A11 und A13, im Folgenden entfällt das wirbeltierspezifische A). Verschiedene Gewebe exprimieren unterschiedliche Annexine, so dass von einem Annexin-Fingerabdruck gesprochen werden kann (Gercke und Moss 2002).

Struktur und Funktion der Annexine

Die Annexine bestehen aus einem hochkonservierten C-terminalen Kern und einem variablen N-Terminus, der spezifisch für das jeweilige Familienmitglied ist (Übersicht in Gercke & Moss 2002). Der Kern enthält vier (Annexin 6: acht) sogenannte Annexin-*Repeats*, calciumbindene Domänen, die bisher nur bei Annexinen beschrieben wurden. Sie bestehen aus je etwa 70 Aminosäuren, die in fünf α -Helices organisiert sind. Bei ausreichend hoher Calciumkonzentration binden die Annexine über Typ-II und Typ-III Calciumbindestellen reversibel an negativ geladene Membranlipide. Die Tertiärstruktur des Moleküls ähnelt einer gebogenen Scheibe, die Calcium- und Membranbindestellen befinden sich auf der konvexen Seite (Abb. 1.5). Die N-Termini der verschiedenen Annexine variieren stark in Länge und Sequenz. So weist der N-Terminus von Annexin 4 zwölf Aminosäuren auf, während die N-terminalen Domänen der Annexine 7 und 11 über 100 Aminosäuren umfassen. Die N-Termini befinden sich auf der konkaven, membranabgewandten Seite des Moleküls (Liemann & Lewit-Bentley 1995, Swairjo & Seaton 1994) und enthalten Motive für Phosphorylierung, Ligandenbindung und proteolytische Spaltung (Raynal et al. 1993). Sie werden für die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Familienmitglieder verantwortlich gemacht (Swairjo & Seaton 1994).

Annexine sind cytosolische Proteine, denen vor allem eine Rolle bei der Aggregation von Membranen, der Organisation von Membranstrukturen und beim Vesikeltransport zugeschrieben wird. Für einige Annexine wurde *in vitro* eine Bindung an zwei Membranen beobachtet, die über eine zusätzliche Kerndomäne, den N-Terminus oder Adapterproteine erfolgt (Rosengarth et al. 2001, Gercke & Moss 2002). Für Annexin 12 zeigen theoretische Modelle eine mögliche Reorganisation der Helixstruktur und die Insertion des Moleküls in eine Membran (Langen et al. 1998). Für Annexine 1, 2, 4 und 5 konnte zudem gezeigt werden, dass sie in bestimmten Situationen, zum Beispiel während der Apoptose, die Zellmembran durchqueren und auf der Plasmamembran an negativ geladene Phospholipide binden (Gercke & Moss 2002). Der Mechanismus der Translokation ist bisher nicht geklärt. Die extrazellulären Funktionen der Annexine unterscheiden sich stark von ihren intrazellulären Funktionen. Während für extrazelluläres Annexin 1 eine Rolle im Immunsystem beschrieben ist, dient extrazelluläres Annexin 2 als Kofaktor für Plasminogen bei der Regulation der Fibrolyse (Ling et al. 2004) und Annexin 5 wirkt möglicherweise anti-koagulierend in der Plazenta (Rand 2000).

Insgesamt ist die Funktion der Annexine nicht gut erforscht. Die starke evolutionäre Konservierung deutet auf eine grundlegende Rolle der Proteinfamilie hin. *Knockout-*

Mäuse für verschiedene Annexine (5, 6, 7) zeigen jedoch keinen starken Phänotyp (Brachvogel et al. 2003, Hawkins et al. 1999, Herr et al. 2001). Da in humanen Geweben zumeist mehrere Annexine exprimiert werden, lässt sich über eine mögliche Redundanz in der Funktion der Familienmitglieder spekulieren. Mehrfach defiziente Mäuse werden möglicherweise einen Hinweis auf die Funktion geben, die Annexine seit Millionen Jahren in den Zellen von Eukaryoten ausüben.

Annexin 1

Wie alle Annexine wird Annexin 1 strukturell und funktionell in den lipid- und calciumbindenden Kern und den spezifischen N-Terminus unterteilt (Abb. 1.5). Der N-Terminus umfasst 40 Aminosäuren und bildet in Abwesenheit von Calcium eine α -Helix, die in die Kerndomäne inseriert und dabei eine Helix des dritten *Repeats* verdrängt (Rosengarth et al. 2001). In Anwesenheit von Calcium reorganisiert sich der dritte *Repeat* und gibt den N-Terminus frei, der nun als bewegliche Helix an der Oberseite des Moleküls für weitere Interaktionen zur Verfügung steht.

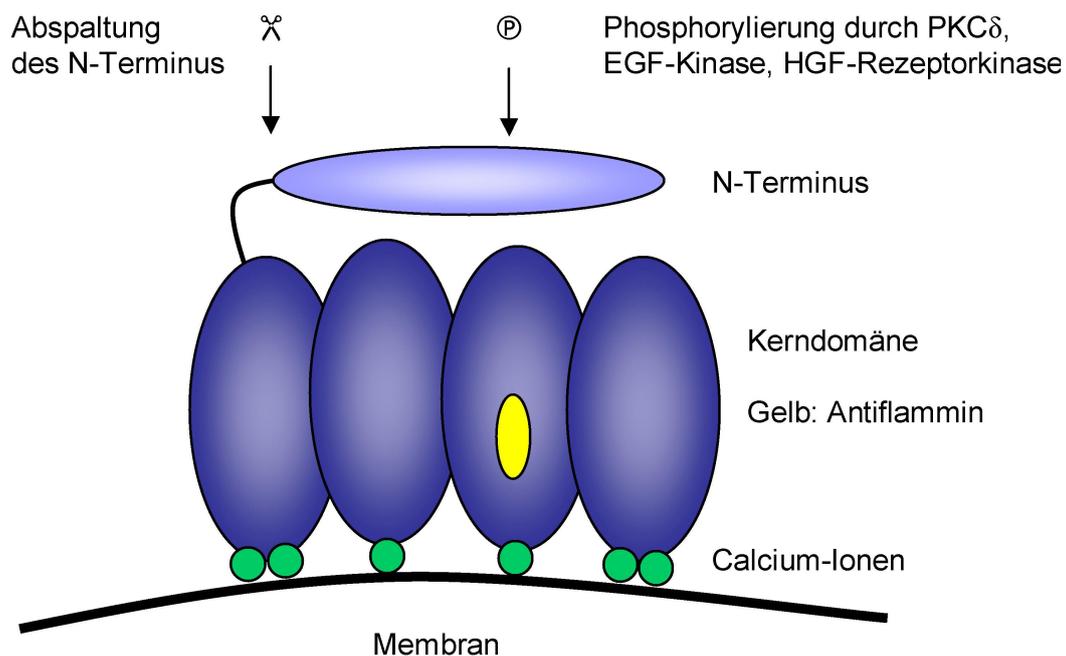


Abbildung 1.5: Funktionelle Domänen und Modifikationen des Annexin 1-Moleküls.

Annexin 1 besteht aus einem beweglichen N-Terminus und einem C-terminalen Kern, der die vier familientypischen Annexin-Repeats umfasst. Der Kern bindet über Calciumionen (grün) an negativ geladene Membranlipide. Der dritte Repeat enthält ein als Antiflammin 2 bezeichnetes anti-inflammatorisches Nonapeptid (gelb). Die immunsuppressiven Eigenschaften des Moleküls werden vor allem dem N-Terminus zugeschrieben, der verschiedene Phosphorylierungsstellen für Threonin- und Serinkinasen besitzt und in Anwesenheit von Calcium von der Kerndomäne abgespalten werden kann. (angelehnt an Gerke et al. 2005).

Der N-Terminus enthält Motive für die Phosphorylierung durch PKC δ , EGF-Kinase und HGF-Rezeptorkinase (Haigler et al. 1987, Oudinet et al. 1993, Skouteris und Schröder 1996), die physiologische Bedeutung der Modifikation ist jedoch unklar. Der N-Terminus kann zudem durch proteolytische Spaltung verkürzt oder vollständig entfernt werden (Debret et al. 2003, Liu et al. 1995, Riess 2006). Eine Abspaltung führt zu einer veränderten Lokalisation in der Zelle sowie zu veränderten Lipid- und Calciumbindungseigenschaften (Seemann et al. 1996). Vermittelt der N-Terminus wie postuliert die spezifischen Funktionen von Annexin 1, führt die proteolytische Entfernung des N-Terminus möglicherweise zu einer Inaktivierung des Proteins oder einer Freisetzung der aktiven Domäne.

Annexin 1 wird vor allem in Zellen des Immunsystems, im Nervensystem und in verschiedenen Epithelien exprimiert (Morand et al. 1995, Dreier et al. 1998). In neutrophilen Granulocyten macht Annexin 1 bis zu 4% des cytosolischen Proteingehalts aus. T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen besitzen ebenfalls eine hohe Annexin 1-Expression, während das Protein in B-Zellen nicht oder nur in geringem Maße nachweisbar ist. Während die Expression von Annexin 1 in diesen Geweben konstitutiv ist, wird das Protein in anderen Geweben differenzierungs- oder stressabhängig induziert. In der Leber beispielsweise kann Annexin 1 in der Embryonalentwicklung und während der Leberregeneration detektiert werden (Della Gaspera et al. 2001, Masaki et al. 1994). In Tumorzellen wurde je nach Tumor eine erhöhte oder erniedrigte Annexin 1 Expression festgestellt. Im Fall einer Brustkrebs-Zelllinie wurde die Expression von Annexin 1 mit einem nicht-metastasierenden Phänotyp in Verbindung gebracht (Kreunin et al. 2004), in einer anderen Veröffentlichung vermittelt Annexin 1 die Resistenz des Tumors gegenüber verschiedenen Medikamenten (Wang et al. 2004). Insgesamt ist die Rolle von Annexin 1 in Tumoren weitgehend ungeklärt.

Annexin 1 wurde seit seiner Entdeckung sowohl intrazellulär als auch extrazellulär mit anti-inflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht. Als aktiver Teil des Moleküls werden sowohl der N-Terminus als auch eine als Antiflammin bezeichnetes Nonapeptid im dritten *Repeat* des Moleküls diskutiert (Miele 2000). Glucocorticoide erhöhen die Expression von Annexin 1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Solito et al. 1994, Castro-Caldas et al. 2002). Intrazellulär wurde Annexin 1 als glucocorticoid-induzierter Inhibitor der Phospholipase A2 und somit einer reduzierten Produktion von Eicosanoiden beschrieben (Wallner et al. 1986). Neueren Erkenntnissen zufolge handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Hemmung von Phospholipasen, da Annexin 1 durch seine Bindung an negativ geladene Phospholipide die Substrate der Enzyme maskiert (Bastian et al. 1993, Raynal et al. 1993). Gleichzeitig induzieren

Glucocorticoide die Externalisation von Annexin 1 an die Zelloberfläche über einen ER/Golgi-unabhängigen Mechanismus (Castro-Caldas et al. 2002). Extrazelluläres Annexin 1 auf Neutrophilen vermindert die Adhäsion von Neutrophilen an aktiviertes Endothel und damit die Extravasation der Zellen in entzündetes Gewebe (Getting et al. 1997). Annexin 1 verringert die Adhäsion zum einen durch das Abwerfen (*Shedding*) von L-Selectin-Molekülen von der Oberfläche der Neutrophilen und zum anderen über eine Interaktion mit dem Formylpeptidrezeptor (FPR) und seinem Homologen FPRL1 auf Endothelzellen (Walther et al. 2000, Perretti et al. 2001, Gavins et al. 2003). Als aktive Domäne wird sowohl der N-Terminus als auch das Antiflammin diskutiert (Yang et al. 1997, Walther et al. 2000, Zouki et al. 2000, Moreno 2006).

Der Phänotyp der Annexin 1-Knockout-Maus bestätigt eine anti-inflammatorische Funktion für Annexin 1: In den Annexin 1-defizienten Mäusen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukocyten gestört und polymorphkernige Granulocyten wandern vermehrt spontan ins Gewebe ein. Die Mäuse weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Entzündungen auf und sprechen nur bedingt auf Glucocorticoide an (Hannon et al. 2002, Roviezzo et al. 2002, Yang et al. 2004).

Auch Monocyten reagieren auf Annexin 1 und seine N-terminalen Peptide. So hemmt Annexin 1 die Migration von Monocyten (Getting et al. 1997), und sowohl Annexin 1 als auch ein N-terminales Peptid reduzieren die LPS-induzierte NO-Sekretion der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 (Ferlazzo et al. 2003). In unserer Arbeitsgruppe weisen Ergebnisse zudem darauf hin, dass Annexin 1 die TNF-Sekretion von primären dendritischen Zellen hemmt und ein anti-inflammatorisches Signal auf apoptotischen Zellen vermitteln könnte (Weyd 2005). Annexin 1 war bereits 2003 als „*Eat-me*“-Signal auf apoptotischen Zellen beschrieben worden (Arur et al. 2003). Eine Rolle von Annexin 1 bei der Phagozytose konnte jedoch in unserem System nicht bestätigt werden (Weyd 2005).

2 Aufgabenstellung

Die periphere Toleranz umfasst verschiedene Mechanismen, die die Eliminierung oder das Abschalten potentiell autoreaktiver T-Zellen sicherstellen, die nicht durch die zentrale Toleranz im Thymus eliminiert wurden. Periphere T-Zellen werden abgeschaltet, wenn sie in einem Nicht-Gefahren-Kontext auf ihr MHC-präsentiertes Antigen treffen. Ein wichtiger Mechanismus der peripheren Toleranz ist das Abschalten autoreaktiver T-Zellen durch dendritische Zellen, die Selbstantigene aus zuvor phagozytierten apoptotischen Zellen präsentieren. Welche Moleküle auf der Oberfläche apoptotischer Zellen ein anti-inflammatorisches Signal an dendritische Zellen vermitteln, ist jedoch weitgehend ungeklärt. Als möglicher Vermittler dieses anti-inflammatorischen Signals wurde in unserer Arbeitsgruppe das Protein Annexin 1 identifiziert, das in einem frühen Stadium der Apoptose aus dem Cytosol an die Zelloberfläche transloziert wird (Weyd 2005).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Annexin 1 bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals von apoptotischen Zellen zu dendritischen Zellen eine Rolle spielt und ob eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Annexin 1 auf dendritische Zellen zu einer veränderten T-Zell-Antwort führt.

Hierzu sollten Kokultur-Experimente mit Phagozyten und apoptotischen Zellen bzw. rekombinantem Annexin 1 durchgeführt werden. Um die Einschränkungen primärer humaner dendritischer Zellen zu umgehen, sollte zunächst ein Modellsystem mit einer geeigneten humanen Zelllinie etabliert werden.

Um die Rolle von Annexin 1 auch im murinen System zu untersuchen, sollten monoklonale Antikörper gegen murines Annexin 1 generiert und die mit der humanen Zelllinie durchgeführten Experimente auf das murine System übertragen werden. Kokultur-Experimente mit primären murinen dendritischen Zellen und primären murinen T-Zellen sollten zudem Aufschluss über die weitere Prozessierung eines möglichen Annexin 1-Signals geben und letztendlich zur Entwicklung eines *in-vivo*-Systems führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.2 Häufig verwendet Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer (prokaryotisch)	500 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Imidazol, 5 mM Tris (pH 7), 0,5 mg/ml Lysozym, 1 % (w/v) Complete Proteaseinhibitor-Cocktail
TST (Proteinaufreinigung)	50 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
HAc (Proteinaufreinigung)	0,5 M Essigsäure, pH 3,4
NH ₄ Ac (Proteinaufreinigung)	5 mM Ammoniumacetat, pH 5
Spaltungspuffer (Proteinaufreinigung)	50 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Lysepuffer (eukaryotisch)	150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM PMSF, 10 % (w/v) Glycerol, 1 % (w/v) Triton X-100, 1 Tablette Complete Proteaseinhibitor / 500 ml Puffer
Sammelgel (SDS-PAGE)	24 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 % (w/v) Acrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (w/v) TEMED
Trenngel (SDS-PAGE)	37,5 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10-12 % (w/v) Acrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) APS, 0,1 % (w/v) TEMED
Probenpuffer reduz. (5x) (SDS-PAGE)	50 % (v/v) Glycerol, 10 % (w/v) SDS, 50 mM Tris (pH 6,8), 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,25 mg/ml Bromphenolblau

Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-Base, 0,19 M Glycin, 1 % (w/v) SDS
Coomassie-Lösung	0,26 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 40 % Methanol, 10 % Eisessig
Entfärber (Coomassie)	30 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Fixierer (Silberfärbung)	30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure
Sensitivierungslösung (Silberfärbung)	0,3 % (w/v) Kaliumtetrathionat, 500 mM Kaliumacetat, 30 % (v/v) Ethanol
Silbernitratlösung (Silberfärbung)	0,2 % (w/v) Silbernitrat
Entwickler (Silberfärbung)	10 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 3 % (w/v) Kaliumcarbonat, 37 % (v/v) Formalin
Stopp-Lösung (Silberfärbung)	300 mM TRIS, 5 % (v/v) Eisessig
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris, 0,19 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,037 % (w/v) SDS
Blocklösung (Western Blot)	PBS, 5 % (w/v) Milchpulver
Waschpuffer (Westernblot)	PBS, 0,05 % (w/v) Tween-20
Coatingpuffer 1 (ELISA)	100 mM Natriumcarbonat, pH 9,6
Coatingpuffer 2 (ELISA)	200 mM Natriumphosphat, pH 6,5
Waschpuffer (ELISA)	PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA-Puffer	PBS, 10 % (v/v) FCS
Citratpuffer (ELISA)	0,03 M Zitronensäure, 0,07 M Natriumcitrat, pH 5,0
OPD-Lösung (ELISA)	0,5 mg/ml o-Phenylendiamin, 0,1 % (v/v) H ₂ O ₂
Annexin-Bindepuffer	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , pH 7,4
Griess 1	1 % (w/v) p-Aminobenzensulfonamid, 2,5 % (v/v) konzentrierte Phosphorsäure
Griess 2	0,1 % Naphthylethylendiamin-Dihydrochlorid, 2,5 % (v/v) konzentrierte Phosphorsäure
Waschpuffer (Antikörper)	0,1 M Tris-HCl, pH 8

Elutionspuffer (Antikörper)	0,1 M Glycin-HCl, pH 3
Neutralisationspuffer (Antikörper)	1 M Tris-HCl, pH 9,0
Pepsin-Puffer	20 mM Natriumacetat, pH 4,5
FITC-Kopplungspuffer	200 mM Natriumcarbonat (17.3 g/l NaHCO ₃ + 8.6 g/L Na ₂ CO ₃)
Biotin-Kopplungspuffer	100 mM Natriumcarbonat, pH 8,4
PBS	137 mM NaCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
MACS-Puffer	PBS, 0,5 % (w/v) HSA, 2 mM EDTA
FACS-Puffer	PBS, 10 % (v/v) FCS
Nicolettipuffer	0,1 % (w/v) Natriumcitrat, 0,1 % (w/v) Triton X- 100, 50 µg/ml Propidiumiodid

3.1.3 Biologisches Material

Ratten-und Mausstämme

Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories bezogen oder im hauseigenen Tierstall gezüchtet.

Zelllinie	Charakterisierung
DA	weit verbreiteter Ratten-Inzuchtstamm
C57BL/6	weit verbreiteter Maus-Inzuchtstamm
Balb/c	weit verbreiteter Maus-Inzuchtstamm
C57BL/6 OT-II	Maus mit transgenen T-Zellrezeptor α - und β -Ketten; fast alle CD4+ T-Zellen exprimieren einen T-Zellrezeptor, der ein Peptid des Ovalbumin in MHC II (IA ^b) erkennt

3.1.4 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Herkunft	Referenz
Jurkat	Humanes T-Zell-Lymphom	(Schneider et al. 1977)
CCRF-CEM	Humanes T-Zell-Lymphom	(Foley et al. 1965)
U-937	Humanes Histiocytom	(Sundstrom & Nilsson 1976)
J774.A1	Murine Monocyten / Makrophagen	(Ralph et al. 1976)
X63AG8.653	Murines Myelom	(Kearny et al. 1979)
D, 258, 322, 333, 341, 344, 363, 364, 375, 429, 42TC	Murine Thymome	(P. H. Krammer)
DC 27.1	Murines T-Zell-Hybridom	(Edmunds et al. 1999)
8D10, 13H11, 16G4	Ratten B-Zell-Hybridome	

3.1.5 Prokaryotische Zellen und Vektoren

Stamm/Vektor	Herkunft / Referenz
pET-41a(+)	Novagen, Madison, USA
<i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
BL21(DE3)pLysS pTK1 hAnx1	Masterarbeit I. Vogler 2005
BL21(DE3)pLysS pTK1 hAnx1ΔN	Masterarbeit I. Vogler 2005
BL21(DE3)pLysS pTK1 mAnx1	Masterarbeit I. Vogler 2005

3.1.6 Antikörper

Antikörper gegen humane Antigene

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
DAC5 Maus (IgG2a)	Annexin 1	Dissertation H. Weyd 2005
anti-Annexin 1 Maus (IgG1)	Annexin 1	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Annexin 1 Kaninchen (polyklonal)	Annexin 1	Zymed, San Francisco, USA
anti-CD11c FITC Maus (IgG1)	CD11c	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD11b PE Maus (IgG1)	CD11b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD83 FITC Maus (IgG1)	CD83	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD14 FITC Maus (IgG1)	CD14	Immunotools, Friesoythe
anti-HLA-DR FITC Maus (IgG2b)	HLA-DR	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD86 PE Maus (IgG2b)	CD86	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD40 PE-Cy5.5 Maus (IgG1)	CD40	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD31 FITC Maus (IgG1)	CD31	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Erk Maus (IgG1)	Erk 1	R&D Systems, Wiesbaden
anti-Tubulin Maus (IgG1)	Tubulin α	Sigma, München

Antikörper gegen murine Antigene

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
8D10 Ratte (IgG2a)	Annexin 1	
13H11, 16G4,	GST	

Ratte (IgG2a)		
anti-CD11c PE Hamster (IgG)	CD11c	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD11b PE Ratte (IgG2b)	CD11b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD83 APC Ratte (IgG2b)	CD83	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-F4/80 FITC Ratte (IgG2a)	F4/80	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-MHC FITC Maus (IgM)	MHC I-A ^b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD86 PE Ratte (IgG2a)	CD86	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD40 PE Ratte (IgG2a)	CD40	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD45R FITC Ratte (IgG2a)	CD45R	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD4 FITC Ratte (IgG2b)	CD4	Immunotools, Friesoythe
anti-TCR V β 8 PE Maus (IgG2a)	TCR V β 8	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-TCR V α 2 Ratte IgG2a	TCR V α 2	Caltag Laboratories, Burlingame, USA

Zweitantikörper

Name	Antigen	Herkunft, Referenz
anti-Ratte IgG HRP Ziege polyklonal	Ratte IgG	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Ratte IgG HRP Ziege polyklonal	Ratte IgG	Biømeda, Foster City, USA
anti-Ratte IgG FITC Ziege polyklonal	Ratte IgG	Biømeda, Foster City, USA
anti-Maus IgG HRP	Maus IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Ziege polyklonal

3.1.7 Reagenzien

Produkt	Hersteller
Annexin 5 FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
BCA-Kit	Pierce, Rockford, USA
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, München
CFSE	Molecular Probes, Eugene, USA
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Vybrant DiD	Molecular Probes, Eugene, USA
DPBS	Gibco BRL, Karlsruhe
ECL-Lösungen	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	Sigma, München
FITC-gekoppelte Latex-Kügelchen	Molecular Probes, Eugene, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutamax	Gibco BRL, Karlsruhe
GSH-Sepharose-Kügelchen	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
HAT Supplement	Gibco BRL, Karlsruhe
HAT Supplement	Gibco BRL, Karlsruhe
Humanes GM-CSF	Leukine [®] , Schering, Berlin
Humanes IL-4	Immunotools, Friesoythe
Humanes IL-2	LBRM-33 5A4 Überstand (Gillis et al. 1980)

Humanes Serumalbumin (HSA)	Baxter, Unterschleißheim
IgG-Sepharose	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
IMDM-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, München
Komplettes Freund'sches Adjuvans	Sigma, München
LAL Endotoxin Kit	Cambrex, Walkersville, USA
LAL-Wasser	Cambrex, Walkersville, USA
LB-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lipoteichonsäure (Lta)	Sigma, München
LPS (aus <i>E. coli</i> 026:B6)	Sigma, München
LS-Säulen	Miltenyi, Gladbach
Magnetic Kügelchen (Zellaufreinigung)	Miltenyi, Gladbach
Mausserum	Dako, Glostrup, Dänemark
β -Mercaptoethanol	Neolab, Heidelberg
Murines GM-CSF	Immunotools, Frisothe
Murines M-CSF	L929-Überstand (Antoine et al. 1991)
Murines IL-3	X6310-IL3-Überstand (Karasuyama & Melchers 1988)
Natriumpyruvat	Sigma, München
OptiEIA Cytokin-ELISA Kits	BD Pharmingen, Heidelberg
Ovalbumin (Ova)	Sigma, München
Penicillin / Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Pepsin-Agarose	Pierce, Rockford, USA
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma, München

Phosphatidylserin (PS)	Sigma, München
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma, München
Polyethylenglycol (PEG) 1500	Roche, Mannheim
Polymorphprep	Axis Shield, Oslo, Norwegen
PreScission Protease	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Protein-A-Sepharose	Sigma, München
Protein-G-Sepharose	Sigma, München
Ratten-IgG	Southern Biotechnology, Birmingham
Rattenserum	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
RPMI-Medium (pulversiert)	Gibco BRL, Karlsruhe
Streptavidin-HRP	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Streptavidin- PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Sulfo-LC-NHS-(+)-Biotin	Molecular Probes, Eugene, USA
Trypsin / EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe

3.1.8 Geräte und Material

Es wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien (Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen etc.) der Firmen Renner (Dannstadt), Falcon (Becton Dickinson, San Jose, USA), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden) verwendet. 6-Loch-Schalen für die Differenzierung humaner dendritischer Zellen wurden von Falcon bezogen. Für ELISAs wurden 96-Loch-Platten mit halber Fläche der Firma Corning B.V. (Schiphol-Rijk, Niederlande) verwendet.

Gerät / Material	Hersteller
Autoradiographie-Filme (Hyperfilm)	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Autoradiographie-Hüllen	Rego, Augsburg

Dialyseschläuche	Spectrapor, Roth, Karlsruhe
Durchflusszytometer	FACScan II, Becton Dickinson, San Jose, USA FACS Canto, Becton Dickinson, San Jose, USA
ELISA-Reader	Victor, Wallac, Turku, Finnland
Endotoxin-Säulen	Detoxi-Gel, Pierce, Rockford, USA
Entwicklungsmaschine	Classic E.O.S., Agfa, Köln
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific (Thermo), Dreieich
Gelfiltrationssäulen (PD10)	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Geltrockner	Modell 583, Biorad, München
Inkubator für die Zellkultur	Steri-Cult, Forma Scientific (Thermo), Dreieich
Kühlzentrifuge	Megafuge 3.0 RS, Heraeus (Thermo), Dreieich
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Schüttler	HAT Infors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE & Westernblot-Apparatur	Mini Protean II, BioRad, München
Sezierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Sterile Werkbank	SteriGRAD Hood, Baker, Sanford, USA
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus (Thermo), Dreieich
Ultrazentrifuge	Sorvall Evolution RC, Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Strahler	Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, USA
Zellseparator	Midi-MACS, Miltenyi, Gladbach
Zählkammer n. Neubauer	HBG, Lützellinden

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinchemische Methoden

Aufreinigung von rekombinantem Annexin 1

Humanes und murines Annexin 1 wurde durch die Expression in Bakterien gewonnen. Im Rahmen ihrer Masterarbeit stellte Isabel Vogler die Konstrukte zur bakteriellen Expression von rekombinantem humanen und murinen Annexin 1 her und entwickelte ein Protokoll zu ihrer Aufreinigung (Vogler, Isabel: „Influence of Annexin 1 and its Domains on Cellular Immune Responses“, eingereicht bei der Fachhochschule Mannheim, Fakultät für Biotechnologie). Für die Aufreinigung wurde die DNA-Sequenz von Annexin 1 zunächst um die Sequenz für einen Abschnitt aus bakteriellem Protein A ergänzt. Das veränderte Annexin 1 wurde in BL21(DE3)pLysS pTK1 *E. coli*-Zellen mit Hilfe des bakteriellen Expressionsvektors pET-41a(+) exprimiert.

Für eine Aufreinigung wurden 300 ml Vorkultur in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur 1:10 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 unter Schütteln kultiviert. Expression von Annexin 1 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Bakterien 30 min bei 2070 x g und 4°C pelletiert und einmal mit PBS gewaschen.

Das Pellet wurde gewogen und in einem vierfachen Volumen bakteriellen Lysepuffer unter Schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse erfolgte durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Unterdessen wurden pro Milliliter Lysat 200 µl Protein-G-Sepharose 6-Kügelchen in einem Zentrifugenröhrchen mit je 50 ml der folgenden Puffer für 10 min bei 4°C rollend äquilibriert: 2 x TST, 1 x HAc, 1 x TST 1 x HAc, 2 x TST. Die Zentrifugationen erfolgten für 5 min bei 2500 x g und 4°C. Nach Beendigung der Lyse wurde das Bakterienlysats mit Benzonase im Verhältnis 1:2000 versetzt und 30-60 min bei Raumtemperatur geschüttelt, bis die Lösung flüssig war.

Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 13300 x g und 4°C wurde der Überstand des Bakterienlysats auf die äquilibrierten Sepharose-Kügelchen gegeben und 1-2 h bei 4°C rollend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen 5 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert und nach vollständigem Entfernen des Überstandes mit je 50 ml der folgenden Puffer je 10 min bei 4°C rollend gewaschen: 3 x TST, 1 x NH₄Ac, 1 x Spaltungspuffer. Zu je 100 µl Kügelchen wurden 250 µl Spaltungspuffer und 8 Einheiten PreScission-Protease gegeben, um das Annexin 1-Konstrukt von der

Protein A-Domäne zu trennen, die an den Kügelchen verblieb. Die Proteolyse erfolgte rollend über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die IgG-Kügelchen 10 min bei 1840 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die Kügelchen wurden ein weiteres Mal mit einem kleinen Volumen Spaltungspuffer gewaschen. Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt.

Die PreScission-Protease trug ein GST-Tag und wurde im folgenden Schritt über eine Inkubation mit GSH-Kügelchen aus der Präparation entfernt. Für 3 Liter Ursprungskultur wurde 4 ml GSH-Kügelchen 5 min bei 460 x g und 4°C pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Äquilibrierung der Kügelchen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 50 ml kaltem PBS. Die Proteinlösung wurde zugegeben und das Gemisch 2 h bei 4°C rollend inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 460 x g und 4°C und wurde mehrfach wiederholt, um in der Lösung verbliebene GSH-Kügelchen zu entfernen. Schließlich wurde die Proteinlösung gegen PBS dialysiert (MWCO 10000) und bis zur Entfernung des LPS bei 4°C gelagert.

LPS-Dekontamination

Bakteriell exprimierte Proteine enthalten große Mengen Endotoxin, die dendritische Zellen und Makrophagen stimulieren. Das bakteriell exprimierte Annexin 1 wurde über Detoxigel-Säulen der Firma Pierce dekontaminiert. Alle Puffer wurden mit endotoxinfreiem Wasser angesetzt und vor Gebrauch entgast.

Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen 1% (w/v) Natrium-Desoxycholat regeneriert, mit 5 Säulenvolumen endotoxinfreiem Wasser gewaschen und mit 5 Säulenvolumen endotoxinfreiem PBS äquilibriert. Ein Säulenvolumen Proteinpräparat wurde auf die Säule gegeben und 15 min bei 4°C in der Matrix inkubiert. Das Protein wurde mit PBS eluiert, dessen NaCl-Gehalt auf 0,5 M erhöht worden war, um die Effizienz der Elution zu erhöhen. Nach Reperation mit 5 Säulenvolumen 1 % Natrium-Desoxycholat wurde die Säule zur Dekontamination weiterer Proteinlösung verwendet oder bis zum nächsten Gebrauch in 25 % Ethanol bei 4°C gelagert.

Lyse eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden für 5-10 min bei 460 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in ca. 100 µl eukaryotischen Lysepuffer pro 1×10^6 Zellen aufgenommen und unter gelegentlichem Schütteln 30 min auf Eis lysiert. Die Entfernung von Zellresten erfolgte durch eine Zentrifugation

für 30 min bei 11300 x g und 4°C, die Proteinkonzentration wurde durch einen BCA-Assay bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Lysat bei -20°C gelagert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Größe (Laemmli 1970). Das Gel besteht aus einem polymerisierten Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Durch das Verhältnis der beiden Chemikalien kann die Porengröße des entstehenden Gels variiert und dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine angepasst werden. Die denaturierten Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, das sich mit seinem hydrophoben Rest an die Aminosäurekette anlagert. Die Anzahl der angelagerten SDS-Moleküle ist annähernd proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Da jedes Dodecylsulfat-Molekül eine negative Ladung besitzt, wandern die Proteine im Gel Richtung Anode. Die Laufweite verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Masse.

Die Gele bestanden aus einem 5-prozentigem Trenngel und einem 10 bis 12-prozentigem Sammelgel. Die Gelzusammensetzung ist bei den Puffern aufgeführt. Die Polymerisation wurde mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Die Ausmaße der Gele betragen 80 x 1,5 mm. Das Trenngel war etwa 55 mm hoch, das Sammelgel 15 mm. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte für 1-2 h bei 80 V. Die Gele wurden direkt mit Coomassie- oder Silbernitratlösung angefärbt oder für Western Blot verwendet.

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie Brilliant Blau R250 ist ein aromatischer Farbstoff, der sich über Sulfonsäuregruppen an positiv geladene Aminosäurereste anlagert und zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen verwendet werden kann.

Für eine Coomassie-Färbung wurden die Gele 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend mit Coomassie-Entfärber unter mehrmaligem Wechseln der Lösung bis zur gewünschten Farbeintensität ca. 1,5 h entfärbt. Entfärbte Gele wurden eingescannt und anschließend 2 h bei 60°C getrocknet.

Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Silberfärbung nutzt die Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber, um die im Gel aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Die Proteine im Gel katalysieren diese Reaktion, so dass an proteinhaltigen Stellen die Reduktion wesentlich schneller

erfolgt als im Rest des Gels. Durch das reduzierte Silber wird so ein Abbild der Proteinverteilung im Gel hergestellt (Merril & Pratt 1986).

Die Gele wurden für 2 h in Fixierlösung fixiert und für 45 min in Sensitivierungslösung inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurden die Gele mit Silbernitratlösung imprägniert. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser (15 s) wurden die Gele bis zu einer kontrastreichen Färbung in Entwickler inkubiert (ca. 30-40 min). Die Reaktion wurde mit Stopplösung beendet. Nach erneutem Waschen wurden die Gele eingescannt und anschließend 2 h bei 60°C getrocknet.

Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine in einem nach Größe aufgetrennten Proteingemisch. Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und einem chemilumineszenten Substrat auf einem Autoradiographie-Film sichtbar gemacht.

50 µg Zelllysat oder 1-2 µg rekombinantes Protein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Verfahren geblottet. Gel und Membran befinden sich zwischen zwei horizontalen Metallplatten (Anode und Kathode), der Kontakt zu Kathode und Anode wird durch je drei Lagen mit Transferpuffer benetztem Filterpapier hergestellt. Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von 1 h 45 bei 0,8 mA/cm² Membran. Die Spannung beträgt zunächst 1-2 Volt und steigt im Lauf des Transfers auf 6-8 V an.

Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation in Blocklösung PBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte je nach Antikörper für 4-16 h. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBS-T wurde die Membran für ca. 1 h mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (Verdünnung 1:10000 bis 1:20000). Nach dreimaligem Waschen folgten die Zugabe chemilumineszenter ECL-Lösung und die Belichtung des Films.

Cytokin-ELISA

Der ELISA (englisch: enzyme-linked immunosorbent assay) dient der Detektion von Proteinen in Lösung. Wie im Western Blot wird das Protein spezifisch durch Antikörper erkannt und die Bindung durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht. Im Gegensatz zum Western Blot wird das Protein beim ELISA nicht denaturiert und kann in seiner nativen Struktur vom Antikörper erkannt werden.

Zur Bestimmung der Konzentration von TNF, IL-10 und IFN- γ wurden OptiEIA-Kits der Firma BD Pharmingen verwendet, die nach dem Sandwich-ELISA-System aufgebaut sind. Protein-Standards und Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Das Volumen der Proben und des Standards betrug abweichend von den Angaben des Herstellers 50 μ l pro Loch, da 96-Loch-Platten mit der Hälfte der Standard-Fläche verwendet wurden. Für den Nachweis von humanem TNF und murinem IFN- γ wurde Coating-Puffer 1 (pH 9,6), für murines TNF Coating-Puffer 2 (pH 5,5) verwendet.

Die Beschichtung der Platten mit Capture-Antikörper in Coating-Puffer erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Platten fünfmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit ELISA-Puffer inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der Zellkulturüberstand auf die Platten gegeben und 1,5 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten fünfmal gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Detection-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Nach achtmaligem Waschen erfolgte die Entwicklung mit OPD-Substratlösung (5-10 min). Die Reaktion wurde mit 25 μ l 1,5 M H₂SO₄ abgestoppt und die Farbintensität bei 490 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Annexin 1-ELISA

Um die Konzentration von rekombinatem und endogenem Annexin 1 in Zelllysaten zu bestimmen, wurde ein Annexin 1-Sandwich-ELISA entwickelt. Die Puffer und Waschschritte entsprechen dem Protokoll des Cytokin-ELISAs (Coating-Puffer 1).

Als Capture-Antikörper diente ein polyklonaler anti-Annexin 1-Antikörper der Firma Zymed, der je nach Charge in einer Konzentration von 1:8000 bis 1:16000 eingesetzt wurde. Als Detection-Antikörper wurde biotinylierter DAC5-Antikörper (1 μ g/ml) in Kombination mit Streptavidin-HRP (1 μ g/ml) verwendet. Die Entwicklung sowie das Abstoppen und Messen erfolgten wie beim Cytokin-ELISA. Wurde Annexin 1 direkt in Coating-Puffer an die Platte adsorbiert, waren etwa 100fach höhere Konzentrationen für einen deutlichen Nachweis erforderlich.

ELISA zum Screenen von Hybridomen

Um Antikörper gegen murines Annexin 1 zu erhalten, wurden Ratten mit murinem Annexin 1 immunisiert und ihre Milz- und Lymphknotenzellen mit Tumorzellen fusioniert. Die Überstände der entstandenen Hybridome wurden in einem hierfür entwickelten ELISA auf anti-Maus-Annexin 1-Antikörper untersucht.

Die Platten wurden mit 10 μ g/ml rekombinatem Annexin 1 über Nacht in

Coatingpuffer 1 gecoatet. Die Waschschriffe waren mit den Waschschriffen im Cytokin-ELISA-Protokoll identisch. Das Blocken erfolgte mit PBS / 1 % BSA bei Raumtemperatur. Als Proben wurden die Hybridom-Überstände unverdünnt aufgetragen und 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle diente das Serum der immunisierten Ratte (1:500 in Annexin-Bindepuffer), als Negativkontrolle kommerziell erhältliches Ratten-IgG (1:500 in Annexin-Bindepuffer). Zur Detektion wurde ein Gemisch aus zwei HRP-gekoppelten Antikörpern gegen den Fc-Teil von Ratten-IgG eingesetzt (BD Pharmingen und Biømeda, jeweils 1:2000 in Annexin-Bindepuffer). Die Entwicklung sowie das Abstoppen und Messen erfolgten wie beim Cytokin-ELISA.

NO-Bestimmung

Makrophagen sezernieren nach Stimulation reaktive Sauerstoffverbindungen wie Stickstoffmonoxid (NO). NO wird unter physiologischen Bedingungen schnell zu Nitriten und Nitraten oxidiert. Der Griess-Assay ermöglicht die Bestimmung von Nitriten aus Zellkulturüberständen. Nitrate werden mit dieser Methode nicht erfasst. Nitrite bilden im Assay unter sauren Bedingungen mit Sulfanilsäure ein Diazoniumsalz, das in einem zweiten Schritt mit einem Diamin zu einem violetten Azofarbstoff reagiert. Als Maß für den Nitritgehalt der Probe kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm herangezogen werden.

100 µl Zellkulturüberstand wurden mit 50 µl Griess 1-Lösung und 50 µl Griess 2-Lösung versetzt. Als Standard dienten Verdünnungen einer Natriumnitritlösung in Konzentrationen von 100 µM bis 1,6 µM. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm.

Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung kann über verschiedene Verfahren bestimmt werden. Eine einfache Methode ist der Nachweis mit Hilfe von Kupfersulfat und Bicinchoninsäure (BCA). Zunächst reduzieren die Peptidbindungen des Proteins Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Die Cu^{1+} -Ionen werden von je zwei Molekülen Bicinchoninsäure chelatiert; es entsteht ein dunkelvioletter löslicher Komplex, dessen Absorption bei 560 nm bestimmt werden kann. Die Reaktion wird durch Detergenzien und reduzierende Reagenzien gestört.

Die Bestimmung wurde mit einem BCA-Kit der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 100 µl BCA-Färbelösung wurden in 96-Loch-Platten mit 10 µl der Proteinlösungen bzw. eines BSA-Standards versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Intensität der Färbung wurde über die Messung der Absorption bei

einer Wellenlänge von 560 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Bestimmung der LPS-Konzentration in Lösung

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und aktiviert durch Stimulation des Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4 dendritische Zellen und Makrophagen. Um Effekte durch Verunreinigungen in den verwendeten Puffern und Antikörper- bzw. $F(ab')_2$ -Präparationen auszuschließen, wurde der LPS-Gehalt mit Hilfe des Limulus-Amöbocyten-Lysat (LAL)-Tests der Firma Cambrex bestimmt. Der Test basiert auf der Aktivität eines Enzyms der Amöbocyten der Krabbe *Limulus polyphemus*, das durch LPS aktiviert wird. Die Enzymaktivität in der Probe ist proportional zu ihrem LPS-Gehalt und wird mit Hilfe eines Substrates kolorimetrisch bestimmt. Die Proben wurden je nach erwartetem LPS-Gehalt 1:10 bis 1:1000 in endotoxinfreiem Wasser verdünnt und auf 37°C vorgewärmt. Als Standard dienten Verdünnungen einer Endotoxin-Lösung mit Konzentrationen zwischen 2 und 0,125 Europäischen Units (EU) LPS (1 EU entspricht etwa 0,1 ng/ml LPS). 50 µl Probe wurden mit 50 µl vorgewärmtem Amöbocyten-Lysat versetzt. Nach 6 min Inkubation bei 37°C folgte die Zugabe des Substrates. Nach zehnmütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 10-prozentiger SDS-Lösung abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden aus Zellkultur-Überständen von B-Zell-Hybridomen mit Hilfe einer Protein G-Sepharose-Säule aufgereinigt. Protein G bindet FC-Teile von Rattenantikörpern des IgG2a Subtyps mit hoher Affinität. Nach Bindung des Antikörpers aus 1-2 Litern Hybridom-Überstand wurde die Säule mit ca. 200 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit saurem Elutionspuffer in mehreren Fraktionen in ein gleiches Volumen Neutralisationspuffer; der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Benzolgruppen der aromatischen Aminosäuren Licht; eine Absorption von 1,0 entspricht einer Antikörperkonzentration von 1,4 mg/ml. Die Antikörper wurden gegen steriles, LPS-getestetes PBS dialysiert (MWCO 100000) und sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Protein- und LPS-Konzentration wurde die Antikörperlösung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Herstellung eines $F(ab')_2$ -Fragmentes

Ein Antikörpermolekül unterteilt sich strukturell und funktionell in ein divalentes

antigenbindendes Fragment F(ab')₂ und ein rezeptorbindendes Fragment (Fc). Der Fc-Teil eines Antikörpers vermittelt sekundäre Funktionen wie die Bindung an Fc-Rezeptoren oder die Aktivierung der Komplementkaskade. Um diese Funktionen bei experimentellen Analysen auszuschließen, werden oft antigenbindende F(ab')₂-Fragmente verwendet, deren Fc-Teil zuvor proteolytisch abgespalten wurde. F(ab')₂-Fragmente des DAC5-Antikörpers sowie der gegen Annexin 1 gerichteten polyklonalen Kaninchenantikörper wurden von Dr. H. Weyd produziert und freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt.

500 µl Pepsin-Agarose wurden mit sterilem Pepsinpuffer äquilibriert und für 8 h bei 37°C unter Schütteln mit 20-50 mg des Antikörpers (ebenfalls in sterilem Pepsinpuffer) inkubiert. Die Pepsin-Agarose wurde zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der abgespaltenen Fc-Fragmente über eine Protein A-Sepharose-Säule gegeben. Das gereinigte F(ab')₂-Fragment wurde gegen steriles, LPS-getestetes PBS dialysiert (MWCO 50000) und sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Protein-Konzentration und der LPS-Konzentration wurden die F(ab')₂-Fragmente aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Markierung von Antikörpern mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

Um Antikörper direkt im Durchflusszytometer nachweisen zu können, wurden sie mit dem Autofluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) chemisch gekoppelt. Die Antikörperlösung (1 mg/ml) wurde mit 1/36 Volumen FITC-Kopplungspuffer und 100 µl FITC (1 mg/ml in DMSO) pro Milligramm Antikörper versetzt und 1 h im Dunklen inkubiert. Zur Abtrennung des ungebundenen FITC diente eine Gelfiltrationssäule. Bei stetiger Zugabe von PBS eluiert zunächst das freie FITC als farbige Fraktion, einige Zeit später der FITC-gekoppelte Antikörper. Die Antikörperfraktionen mit der stärksten Färbung wurden vereinigt, auf 1 mg/ml Proteingehalt eingestellt und bei 4°C im Dunklen gelagert.

Markierung von Antikörpern mit Biotin

Um Antikörper nicht in Kombination mit einem Sekundärintikörper verwenden zu müssen, wurden sie mit Sulfo-LC-NHS-(+)-Biotin gekoppelt, das mit Streptavidin-HRP im ELISA oder fluoreszenzmarkiertem Streptavidin im FACS nachgewiesen werden kann.

Der Antikörper wurde auf eine Konzentration zwischen 2 und 4 mg/ml eingestellt und gegen Biotin-Kopplungspuffer dialysiert. Das Sulfo-LC-NHS-(+)-Biotin wurde in DMSO gelöst (10 mg/ml) und in Konzentrationen von 90-360 µg pro Milligramm Antikörper zu der Antikörperlösung gegeben. Das Reaktionsröhrchen wurde mit Hilfe von

Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt und 4 h bei Raumtemperatur rotiert. Es folgte eine Dialyse (MWCO 100000), um das ungebundene Biotin zu entfernen. Der biotinylierte Antikörper wurde bei 4°C im Dunklen gelagert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Eukaryotischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Pulverisiertes Zellkulturmedium RPMI 1640 wurde nach Herstellerangaben in pyrogenfreiem Wasser gelöst. Das Medium wurde sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde das RPMI mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Glutamax supplementiert (supplementiertes RPMI). Für die Kultur von B-Zell-Hybridomen wurden dem Medium zusätzlich 50 µM β-Mercaptoethanol und 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt. Makrophagen wurden in IMDM-Medium kultiviert. Für die Differenzierung und Aktivierung primärer Zellen wurden verschiedene Cytokine verwendet. Nach Erhalt wurden die Cytokine in sterilem, LPS-freiem PBS mit 0.1 % (w/v) BSA gelöst und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

Präparation muriner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus Knochenmark

Zur Differenzierung muriner dendritischer Zellen und muriner Makrophagen werden hämatopoetische Vorläuferzellen benötigt, die aus dem Knochenmark der Beinknochen gewonnen werden können. Für die Sektion wurde durch Hitze oder Alkohol sterilisiertes Sezierbesteck verwendet.

Zur Gewinnung der Vorläuferzellen wurde eine C57BL/6-Maus durch Genickbruch getötet und mit den Extremitäten auf einer Unterlage fixiert. Alle weiteren Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Haut über den Beinen wurde durch einen Schnitt von Hüfte bis Ferse geöffnet und die Knochen durch Entfernung der Muskeln freigelegt. Oberschenkelknochen (Femur) und Unterschenkelknochen (Tibia) wurden unterhalb der Hüfte beziehungsweise oberhalb des Knöchels durchtrennt und samt Kniegelenk in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Nach Entfernung des Kniegelenks und letzter Gewebereste wurden die Knochen in eine zweite Petrischale mit PBS gegeben. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer 23G-Kanüle aus den Hohlknochen gespült und mit dem Kolben einer 1 ml-Spritze mechanisch homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50-ml-Röhrchen überführt und zweimal mit supplementiertem RPMI-Medium gewaschen

(Zentrifugationen für 10 min bei 460 x g und 4°C). Es folgte die Differenzierung zu dendritischen Zellen oder Makrophagen.

Differenzierung muriner dendritischer Zellen

Hämatopoetische Vorläuferzellen wurden entweder mit rekombinantem murinen GM-CSF oder mit GM-CSF-haltigen Überstand der murinen Zelllinie GM-PC zu unreifen dendritischen Zellen differenziert. Bei der Differenzierung mit rekombinantem GM-CSF wurden je 2×10^6 hämatopoetische Vorläuferzellen in 10 ml supplementiertem RPMI-Medium mit 1000 U/ml murinem GM-CSF in einer sterilen unbeschichteten Kulturschale ausgesät. Nach drei Tagen wurden 10 ml Medium mit 1000 U/ml GM-CSF zugefügt, weitere drei bis vier Tage später wurden die dendritischen Zellen vorsichtig von der Platte ab gespült und in 48-Loch-Platten ausgesät (1×10^5 Zellen pro Loch). Bei der Differenzierung mit GM-CSF-haltigen Überstand wurden je 1×10^6 hämatopoetische Vorläuferzellen in 1 ml RPMI-Medium (10 % GM-PC-Überstand, 5 % FCS, 1 % Glutamax) in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium vollständig durch neues Medium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurden nochmals 50% des Mediums durch neues Medium ersetzt. Weitere zwei bis drei Tage später wurden die dendritischen Zellen vorsichtig von der Platte ab gespült und in 48-Loch-Platten ausgesät (1×10^5 Zellen pro Loch).

Differenzierung muriner Makrophagen

Für die Differenzierung zu Makrophagen wurden die restlichen hämatopoetischen Vorläuferzellen in 10 ml IMDM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Glutamax, 10 % M-CSF-haltigem Überstand und 1 % IL-3-haltigem Überstand (Differenzierungsmedium I) in einer sterilen beschichteten Kulturschale ausgesät. Die cytokinhaltigen Überstände wurden aus Kulturen der M-CSF produzierenden Zelllinie L929 und der IL-3 sezernierenden Zelllinie X6310-IL3 gewonnen und freundlicherweise von Dr. Rüdiger Arnold zur Verfügung gestellt. Nach 2-3 Tagen wurden die löslichen Zellen ab gespült, einmal mit Medium ohne Cytokinzusätze gewaschen (5 min bei 460 x g und 4°C) und in 10 ml IMDM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Glutamax und 10 % M-CSF-haltigem Überstand (Differenzierungsmedium II) in einer Zellkulturschale ausgesät. Zwei Tage später wurden die löslichen Zellen abgenommen, zentrifugiert, in 10 ml neues Differenzierungsmedium II aufgenommen und wieder zu den adhärennten Zellen gegeben. Weitere zwei Tage später wurde das Medium abgenommen und erneut frisches Differenzierungsmedium II zugegeben. Sechs Tage nach Umstellung auf Differenzierungsmedium II wurden die Zellen in 48-Loch-Platten ausgesät (1×10^5 Zellen pro Loch).

Präparation lymphoider Organe

Um die Annexin 1-Expression in murinen Geweben zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäusen verschiedene Organe entnommen. Lymphocyten aus Milz und Lymphknoten von OT-II transgenen Mäusen wurden für die Präparation von T-Zellen verwendet. Aus immunisierten DA Ratten wurden Milz und drainierende Lymphknoten für die Fusion mit Tumorzellen präpariert. Milzzellen aus Balb/c Mäusen dienten als Feederzellen für die Vereinzelung der entstandenen B-Zell-Hybridome. Die Präparation geschah grundsätzlich in folgender Reihenfolge: Inguinale Lymphknoten, Thymus, Milz, Leber, mesenteriale Lymphknoten. Um Serum zu erhalten, wurde das Herz nach Entnahme aller Organe geöffnet, so dass mit einer Pipette Blut aus Herz und Brustraum entnommen werden konnte. Für die Sektion wurde durch Hitze oder Alkohol sterilisiertes Sezierbesteck verwendet.

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und mit den Extremitäten auf einer Unterlage fixiert. Alle weiteren Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt. Die Haut wurde durch Schnitte vom Abdomen zum Hals und entlang der Extremitäten geöffnet und seitlich aufgespannt. Die inguinalen Lymphknoten befinden sich auf der Innenseite der Haut in der Verzweigung eines Blutgefäßes. Der Brustkorb wurde durch Schnitte vom Ende des Brustbeins bis zu den Schultern geöffnet und der Thymus ohne Beschädigung des Herzens entnommen. Milz und Leber wurden durch ein Öffnen der Bauchhöhle zugänglich gemacht. Die mesenterialen Lymphknoten befinden sich in Assoziation mit der Aufhängung des Darms und können aufgrund ihrer festen Konsistenz und leicht glänzenden Oberfläche vom umgebenden Fettgewebe unterschieden werden. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde darauf geachtet, den Darm nicht zu beschädigen. Alle Organe wurden durch Metallsiebe in PBS homogenisiert und über 40 µm Zellsiebe in Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (10 min bei 460 x g und 4°C), einmal gewaschen und schließlich für die Fusion, zur Präparation von T-Zellen oder Feederzellen beziehungsweise für die Herstellung von Lysaten verwendet. Blut wurde 15 min bei 1840 x g und 20°C zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und ein weiteres Mal in der Tischzentrifuge für 10 min bei 11.300 x g zentrifugiert. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Präparation muriner CD4-T-Zellen

Für die Bestimmung einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort ist es wichtig, eine möglichst reine und gleichzeitig naive T-Zell-Population zur Verfügung zu haben. Beide Ziele können mit den *Magnetic Bead* Zellaufreinigungskits der Firma Mileniyi erreicht werden. Die Aufreinigung durch magnetische Kügelchen beruht auf

Antikörpern, die für bestimmte Zellpopulationen charakteristische Oberflächenantigene erkennen. Über Biotin werden die an die Zelle gebundenen Antikörper mit Streptavidin-Eisen-Kügelchen gekoppelt. Wird das Zellgemisch über eine Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet, bleiben die auf diese Weise markierten Zellen im Säulenmaterial zurück und können nach Waschen der Säule durch Elution außerhalb des Magnetfeldes in hoher Reinheit gewonnen werden (positive Aufreinigung). Da die Antikörper durch ihre Bindung möglicherweise Signale im Inneren der Zelle auslösen, werden für eine besonders schonende Aufreinigung alle unerwünschten Zellen des Zellgemischs mit Antikörpern markiert. Die gewünschte Population passiert als einzige ungehindert die Säule im magnetischen Feld und befindet sich aufgereinigt im Durchlauf (negative Aufreinigung, „untouched“).

Für die Präparation wurden ein bis zwei OT-II transgenen Mäusen Milz sowie inguinale und mesenteriale Lymphknoten entnommen und wie oben beschrieben präpariert. Die OT-II Mäuse wurden freundlicherweise von Jörg Striegler zur Verfügung gestellt.

Nach der Zentrifugation wurden die Zellen 30-60 sec in 5 ml eiskalter 0,2 % NaCl-Lösung inkubiert, um die Erythrocyten der Milz durch hypotone Lyse zu zerstören. Die Reaktion wurde durch 5 ml 1,6 % NaCl-Lösung gestoppt. Nach Zugabe von 20 ml PBS wurden die Zellen gezählt und 5 min bei 460 x g und 4°C zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe eines „CD4+ untouched“-Kits nach Angaben des Herstellers. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 40 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl biotinyliertem Antikörpergemisch pro 10⁷ Zellen folgte eine zehnmündige Inkubation bei 4°C. Nach Zugabe von 20 µl Streptavidin-Eisen-Kügelchen und 30 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen in ein 10 bis 20-faches Volumen MACS-Puffer aufgenommen und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte LS-Säule in einem magnetischen Zellseparator geladen. Die Säule wurde viermal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült, die Zellen im Durchlauf wurden gezählt, pelletiert (5 min bei 460 x g und 4°C), auf eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert.

Präparation primärer humaner neutrophiler Zellen

Primäre humane neutrophile Granulocyten wurden durch eine Dichte-Zentrifugation aus 80 ml heparinisierendem Vollblut isoliert. 4 ml Polymorphprep wurden mit 5 ml Blut vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (40 min bei 470 x g und 20°C, ohne

Bremse). Nach der Zentrifugation flotieren die mononukleären Lymphocyten auf dem Polymorphprep, während sich die polymorphkernigen Neutrophilen als Ring in der Interphase sammeln. Die Erythrocyten werden unter diesen Bedingungen pelletiert. Der obere Ring aus mononukleären Lymphocyten wurde vorsichtig entfernt und für die Präparation von Monocyten und T-Zellen verwendet. Die Neutrophilen des unteren Ringes wurden vereint und zum Ausgleich der Molarität in ein gleiches Volumen 0,45 % NaCl-Lösung gegeben. Nach Zentrifugation (10 min bei 820 x g und 20°C) wurde der Überstand verworfen und die verbliebenen Erythrocyten durch einminütige Inkubation in eiskalter 0,2 % NaCl-Lösung hypoton lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 ml eiskalter 1,6 % NaCl-Lösung gestoppt, und die Neutrophilen nach erneuter Zentrifugation in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in supplementierten RPMI-Medium in 6-Loch-Zellkulturplatten (3 ml pro Loch) ausgesät und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert.

Präparation primärer humaner Monocyten

Die Präparation von Monocyten erfolgte aus Vollblut nach Präparation von Neutrophilen mit einem CD14-*Magnetic-Bead*-Kit der Firma Miltenyi. Im Gegensatz zur Aufreinigung der CD4+ Zellen handelte es sich um eine positive Aufreinigung. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers, jedoch wurden die Volumina der Antikörperlösung und der Kügelchen-Suspension halbiert, um eine CD14+-Population besonders hohen Reinheitsgrads zu erhalten.

Die Lymphocyten wurden in 80 µl MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl anti-CD14-Kügelchen-Suspension je 1×10^7 Zellen für 15 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen gewaschen und für 10 min bei 300 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl MACS-Puffer je 1×10^8 Zellen resuspendiert und über eine LS-Säule in einem magnetischen Zellseparator gegeben. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde später für die Stimulation der T-Zellen verwendet. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die CD14+ Monocyten mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die Monocyten wurden gezählt, pelletiert (10 min bei 300 x g und 20°C) und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen in supplementiertem RPMI-Medium in 6-Loch-Platte ausgesät (2 ml pro Loch).

Differenzierung primärer humaner dendritischer Zellen

Die Differenzierung dendritischer Zellen erfolgte ausgehend von frisch isolierten Monocyten durch sechstägige Kultivierung in GM-CSF- und IL-4-haltigem Medium (Sallusto & Lanzavecchia 1994). Die adhärenenten Zellen wurden in 6-Loch-

Zellkulturplatten mit 3 ml supplementiertem RPMI-Medium kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4. Nach drei Tagen wurden pro Loch 0,5 ml Medium mit 3500 U/ml GM-CSF und 1500 U/ml IL-4 zugegeben. Nach insgesamt sechs Tagen wurden die unreifen dendritischen Zellen vorsichtig mit dem Zellkultur-Überstand abgenommen, und 1×10^5 Zellen pro Loch in 48-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt.

Stimulation primärer humaner T-Zellen

Zur Untersuchung der Apoptose humaner T-Zellen wurden die verbliebenen Lymphocyten nach Isolation von Neutrophilen und Lymphocyten verwendet. Das verbliebene Zellgemisch bestand etwa zur Hälfte aus T-Zellen und B-Zellen und enthielt darüber hinaus vermutlich geringe Anteile anderer Lymphocyten wie zum Beispiel NK-Zellen. Durch die Stimulation mit PHA und der nachfolgenden Kultivierung in IL-2-haltigem Medium erhielten vor allem die T-Zellen einen Überlebensstimulus. Zum Zeitpunkt der Analyse sechs Tage später enthielt die Kultur hauptsächlich T-Zellen.

Die Zellen wurden einmal mit supplementiertem RPMI gewaschen (5 min bei $460 \times g$ und $4^\circ C$) und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zur Stimulation wurden die Zellen mit $1 \mu g/ml$ PHA über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 25-30 U/ml IL-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

Differenzierung der U937-Zellen

U937-Zellen sind humane monocytische Suspensionszellen, die durch verschiedene Substanzen zu adhärenenten Zellen differenziert werden können, die in ihrem Phänotyp dendritischen Zellen ähneln.

$4-5 \times 10^6$ U937-Zellen wurden in 30 ml supplementiertem RPMI in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät und mit $10 \mu g/ml$ beziehungsweise $100 \mu g/ml$ Phorbolmyristataacetat (PMA) für drei bis vier Tage differenziert. Die differenzierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 4 min mit Trypsin / EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach Abstoppen der proteolytischen Reaktion mit 12 ml Medium wurden die Zellen pelletiert (5 min bei $460 \times g$ und $4^\circ C$) und ohne Verzögerung in 48-Loch-Platten ausplattiert (1×10^5 Zellen pro Loch), um ein Aggregieren der Zellen in Suspension zu verhindern.

J774-Zellen sind murine Makrophagen, die adhärenent wachsen und ohne weitere Differenzierung im Experiment verwendet werden können (2×10^5 Zellen in 48-Loch-

Platten).

Apoptose-Induktion

Um frühapoptotische Zellen zu erhalten, wurden Jurkat T-Zellen oder CEM T-Zellen mit 50 mJ/cm² UV-C-Strahlung bestrahlt (6-Loch-Platten, 2,5 ml Zellsuspension pro Loch) und für 2 h in supplementiertem Medium bei 37°C inkubiert. Primäre Neutrophile sterben nach Entnahme aus dem Körper durch Entzug von Überlebenssignalen spontan und zeigen etwa 24 h nach Blutentnahme die typischen Charakteristika frühapoptotischer Zellen. Primäre T-Zellen sind resistenter gegenüber UV-Licht als T-Zelllinien und wurden mit UV-C-Dosen zwischen 200 und 600 mJ/cm² bestrahlt und nach 4-6 h im FACS analysiert.

Kokultur-Experimente mit apoptotischen Zellen

Um zu untersuchen, ob apoptotische Zellen die Cytokinsekretion und Reifung von Phagozyten beeinflussen, wurden Kokultur-Experimente durchgeführt.

Je 1×10^5 (U937) beziehungsweise 2×10^5 (J774) Phagozyten wurden in 500 µl supplementiertem RPMI-Medium in 48-Loch-Platten ausgesät. Nachdem die Zellen adhärirt hatten (30-60 min), wurde das Medium ausgetauscht und frühapoptotische Zellen wurden in einem Verhältnis zwischen 1:1 und 1:10 (Phagozyten zu apoptotischen Zellen) zugegeben. Als frühapoptotische Zellen dienten mit UV-C bestrahlte J16- oder CEM-Zellen beziehungsweise primäre humane Neutrophile an Tag 1 nach Isolation. 3 h (U937) beziehungsweise 4 h (J774) später wurden die Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS, aus *E. coli* 026:B6) oder Lipoteichonsäure (Lta) stimuliert. Nach ca. 18 h wurden 250 µl Überstand entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Überstände wurden im ELISA auf TNF und IL-10 untersucht, die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert und ca. 48 h nach LPS-beziehungsweise Lta-Zugabe in Bezug auf die Expression von Oberflächenmarkern im Durchflusszytometer untersucht. Wurde das Annexin 1 auf den apoptotischen Zellen durch den Einsatz von anti-Annexin 1-Antikörpern blockiert, wurden die apoptotischen Zellen vor ihrer Zugabe zu den Phagozyten kurz mit der Antikörperlösung vorinkubiert. In Transwell-Experimenten wurden die apoptotischen Zellen nicht direkt zu den Phagozyten gegeben, sondern befanden sich in einem Transwell-Einsatz, dessen Membran mit Poren von 0,8 µm Durchmesser lediglich den Austausch von Molekülen, jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt erlaubte.

Experimente mit rekombinantem Annexin

Um den Einfluss von rekombinantem Annexin 1 auf Phagozyten zu untersuchen,

wurden analog zu den Kokultur-Experimenten mit apoptotischen Zellen Experimente mit rekombinantem humanen und murinen Annexin 1 durchgeführt. Hierbei unterschieden sich die Experimente, in denen lösliches Annexin 1 verwendet wurde, in der zeitlichen Abfolge von den Experimenten, in denen an Phosphatidylserin (PS) gebundenes Annexin 1 zum Einsatz kam. Für die Experimente mit löslichem Annexin 1 wurden je 1×10^5 (U937, primäre murine dendritische Zellen) beziehungsweise 2×10^5 (J774) Phagozyten in 500 μ l Medium in 48-Loch-Platten ausgesät. Nach 30-60 min wurde bei U937- und J774-Zellen das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Bei den primären murinen dendritischen Zellen entfiel dieser Schritt, da die Zellen im unreifen Zustand nicht adhären sind. Lösliches Annexin 1 wurde in Konzentrationen zwischen 1-10 μ g/ml zu den Phagozyten gegeben. Nach 3 h (U937) bzw. 4 h (J774, primäre murine dendritische Zellen) wurden die Phagozyten mit LPS bzw. Lta stimuliert. Das Abnehmen und Analysieren der Überstände sowie die durchflusszytometrische Analyse der Phagozyten erfolgte wie in den Kokultur-Experimenten.

Für die Experimente mit an Phosphatidylserin gebundenem Annexin 1 wurden die Zellkulturplatten zunächst über Nacht mit in Methanol gelöstem Phosphatidylserin inkubiert (0,3 μ g/ml). Das Methanol verdunstet und eine Phosphatidylserin-beschichtete Platte bleibt zurück. Die Löcher wurden zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen und mit Annexin-Bindepuffer beziehungsweise 1-5 μ g Annexin 1 pro Loch in Annexin-Bindepuffer inkubiert. Nach 1-2 h wurde der Annexin-Bindepuffer entfernt und 1×10^5 Phagozyten (U937, primäre murine dendritische Zellen) beziehungsweise 2×10^5 (J774) Zellen pro Loch ausgesät. Nach 3 h (U937) beziehungsweise 4 h (J774, primäre murine dendritische Zellen) wurden die Phagozyten mit LPS beziehungsweise Lta stimuliert. Das Abnehmen und Analysieren der Überstände sowie die durchflusszytometrische Analyse der Phagozyten erfolgte wie in den Kokultur-Experimenten.

Vybrant DiD-Markierung von T-Zellen

Vybrant DiD ist ein lipophiler Farbstoff, der sich in die Membranen lebender Zellen einlagert und in Fluoreszenz 3 des Durchflusszytometers nachweisbar ist.

Für die Markierung mit Vybrant DiD wurden T-Zellen für 10 min bei 5000 x g und 20°C pelletiert und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und mit 1 μ l Vybrant DiD pro 1×10^6 Zellen 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 10 min bei 5000 x g und 20°C zentrifugiert und vorsichtig in angewärmtem supplementiertem RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen und bis zur weiteren

Verwendung in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml im Brutschrank inkubiert.

Phagocytose-Experimente

Um die Aufnahme-Kapazität der Phagozyten zu untersuchen, wurden Phagocytose-Experimente mit FITC-gekoppelten Latex-Kügelchen und DiD-markierten apoptotischen Zellen durchgeführt. Apoptotische Zellen wurden erst mit Vybrant DiD markiert und anschließend wie oben beschrieben mit UV-C-Licht bestrahlt. Phagozyten wurden in 24-Loch-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen pro Loch) und 1-2 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden Latex-Kügelchen (zwischen 1×10^5 und 1×10^6) oder apoptotische Zellen (ebenfalls zwischen 1×10^5 und 1×10^6) zugegeben, so dass bei der Ernte der Zellen 4 h später die Zellen jeweils unterschiedlich lange mit Kügelchen beziehungsweise apoptotischen Zellen inkubiert waren. Die Phagocytose wurde im FACS bestimmt. Bei der Phagocytose apoptotischer Zellen wurden die Phagozyten zusätzlich mit einem geeigneten FITC-markierten Antikörper markiert (zum Beispiel anti-CD31 Antikörper), so dass doppelt positive Zellen (FITC und DiD) leicht identifiziert werden konnten.

CFSE-Färbung von T-Zellen

Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidester (CFSE) ist ein farbloser Stoff, der passiv in lebende Zellen diffundiert. In der Zelle formt er mit Aminen fluoreszierende Aggregate, die nicht wieder aus der Zelle herausdiffundieren und bei der Teilung der Zelle zu gleichen Teilen in den beiden Tochterzellen verbleiben. Da jede Zellteilung die Intensität der Fluoreszenz um die Hälfte verringert, kann durch die Fluoreszenz der Zellen im Durchflusszytometer die Anzahl der Teilungen bestimmt werden, die die Zellen seit ihrer Markierung durchlaufen haben.

Für die Färbung mit CFSE wurden die Zellen 5 min bei $5000 \times g$ und 20°C pelletiert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in warmem, sterilem PBS / 0,1 % BSA aufgenommen. Pro Milliliter Zellsuspension wurde $1 \mu\text{l}$ 5 mM CFSE Stocklösung zugegeben. Die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde ein fünffaches Volumen eiskaltes Medium zugegeben und die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei $5000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, noch zweimal mit eiskaltem Medium gewaschen und schließlich in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert.

Kokultur-Experimente mit T-Zellen

Dendritische Zellen interagieren *in vivo* in den Lymphknoten mit T-Zellen. Diese

Interaktion entscheidet darüber, ob die T-Zellen aktiviert werden oder nicht. Um zu untersuchen, ob der Kontakt mit Annexin 1 zu einem veränderten Signal der dendritischen Zellen gegenüber T-Zellen führen, wurden Kokultur-Experimente mit primären murinen dendritischen Zellen und OT-II CD4+ T-Zellen durchgeführt.

Primäre murine dendritische Zellen wurden wie oben beschrieben mit Annexin 1 inkubiert (mit oder ohne Phosphatidylserin). Parallel zum LPS wurden 10 µg/ml Ovalbumin zugegeben. Statt die dendritischen Zellen zwei Tage später für die durchflusszytometrische Analyse zu verwenden, wurden ca. 5×10^5 CFSE-markierte OT-II CD4+ T-Zellen zugegeben. Drei, vier und fünf Tage später wurde die Kokultur vorsichtig resuspendiert und 150 µl entnommen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde im ELISA auf Interferon-γ (IFN-γ) untersucht, die T-Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer auf ihre Proliferation hin untersucht.

Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen

Ein Durchflusszytometer ermöglicht die Analyse der Oberflächenmarker einzelner Zellen. Die Zellen einer Suspension werden im Gerät vereinzelt und mit ein oder zwei Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge bestrahlt. Werden die Oberflächenmoleküle der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge angeregt, das wiederum vom Gerät mit Hilfe mehrerer Detektoren quantifiziert wird. Ein Durchflusszytometer ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Oberflächenantigene auf Einzelzellebene. In fixierten Zellen ist auch der Nachweis intrazellulärer Proteine möglich.

Zur Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker wurden 2×10^5 Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 460 x g und 4°C pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen für 15 min mit 25 µl 20 % Maus- oder Rattenserum in FACS-Puffer inkubiert (je nach Ursprung der verwendeten Antikörper), um Fc-Rezeptoren abzusättigen. Alle Inkubationen erfolgten auf Eis, um eine Internalisierung von Oberflächenmoleküle zu verhindern. Für die Antikörper wurde ein Mastermix angesetzt (je nach Antikörper 3-5 µl Antikörper pro 50 µl Färbevolumen) und in 25 µl Aliquots auf die Proben verteilt. Nach 15-30 min Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer für die Analyse im FACS aufgenommen. War der Erstantikörper nicht fluoreszenzmarkiert, wurden die Zellen 15-30 min in FACS-Puffer mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper (0,5-1 µl Antikörper pro 50 µl Färbevolumen) inkubiert und nach erneutem Waschen in 100 µl FACS-Puffer für die Analyse aufgenommen. Für die Analyse von Annexin 1 (DAC5

bzw. 8D10) sowie die Analyse von Phosphatidylserin (Anx5) wurde statt FACS-Puffer Annexin-Bindepuffer verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Cell Quest Pro.

Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti

Mit Hilfe einer von Nicoletti und Kollegen etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden (Nicoletti et al. 1991). Der Fluoreszenzfarbstoff dringt in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, sodass die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und den in Teilung befindlichen tetraploiden Zellkernen lassen sich die apoptotischen Zellkerne mit subdiploidem DNA-Gehalt quantifizieren.

2×10^5 Zellen wurden in 250 μ l Nicolettipuffer für 12-48 h bei 4°C unter Lichtabschluss lysiert und im FACS in Fluoreszenz 2 analysiert. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet: $[(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose})] \times 100$.

Immunisierung von Ratten

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen murines Annexin 1 wurde rekombinantes murines Annexin 1-GST-Fusionsprotein in drei DA Ratten injiziert. Das Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Dr. Diana Mačašev zu Verfügung gestellt. Die erste Injektion erfolgte subkutan in Kombination mit Komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA), alle weiteren Injektion peritoneal mit reinem Fusionsprotein in PBS. Die Injektionen fanden vier bis fünf Mal in einem Abstand von drei bis vier Wochen statt. Pro Injektion wurden je 100 μ g Antigen in jeweils 100 μ l Lösung injiziert. Die Immunisierungen wurden im Antrag 35-9185.81/A-59/03 durch die Ethikkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe genehmigt.

Fusion der primären Lymphocyten und Ag8-Tumorzellen

Kohler & Milstein entdeckten 1975 als erste, dass durch die Fusion primärer B-Zell-Blasten mit einer Myelomlinie unsterbliche Hybridomzellen gewonnen werden können, die die Antikörper des B-Zell-Partners produzieren. Die Zellen werden mit Hilfe von Polyethylenglycol (PEG) verschmolzen und über ihre Aminopterin-Verträglichkeit selektiert. Aminopterin hemmt die Synthese der Nucleotide Thymidintriphosphat (TTP) und Guanosintriphosphat (GTP). TTP kann alternativ durch die Thymidin-Kinase aus Thymidin synthetisiert werden, GTP durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGRT) aus Hypoxanthin. Die verwendeten Myelomzellen besitzen keine

HGRT und sterben in Aminopterin-haltigem Medium (HAT) nach wenigen Tagen. Die primären Lymphocyten können GTP aus Hypoxanthin synthetisieren, sind aber nicht unsterblich wie die Tumorzellen. Nur die aus der Fusion beider Zelltypen entstandenen Hybride überleben die Selektion dauerhaft. Sie vereinen die Unsterblichkeit der Myelomzellen mit der Antikörperproduktion der B-Zellen und ermöglichen so die kontinuierliche Produktion großer Mengen monoklonalen Antikörpers.

Eine immunisierte Ratte wurde mit Hilfe von CO₂ getötet und es wurden Milz und drainierende Lymphknoten sowie Blut für Serum entnommen. Milz und Lymphknoten wurden homogenisiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach kurzem Warten wurde die Zellsuspension in ein neues Röhrchen überführt, um bereits abgesunkene Gewebereste zu entfernen. Die Zellen wurden 5 min bei 820 x g und 20°C pelletiert, parallel wurde mit 1,5 x 10⁸ Ag8-Tumorzellen ebenso verfahren. Beide Pellets wurden mit einer Pasteurpipette resuspendiert und zweimal mit 50 ml DPBS gewaschen. Die Rattenzellen wurden mit den Ag8-Zellen vereinigt und noch einmal mit 50 ml DPBS gewaschen. Nach vorsichtigem Lösen des Pellets von außen durch „Fingerschnippen“ wurden 1,5 ml vorgewärmtes PEG 1500 zugegeben, und die Suspension wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt. Nach 90 sec wurden 1,5 ml vorgewärmtes DPBS hinzugefügt und die Suspension wiederum vorsichtig mit der Pipette gemischt. Nach weiteren 90 sec wurden über 3-5 min unter gelegentlichem Schütteln tropfenweise 10 ml DPBS zugegeben. Nach 60 sec Inkubationszeit wurden weitere 10 ml DPBS zugegeben und die Zellen 5 min bei 820 x g und 4°C pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden vorsichtig 5 ml DPBS auf das Pellet gegeben, weitere 5 ml DPBS wurden durch die Suspension „gepustet“. Die Zellen wurden vorsichtig einmal auf- und abpipettiert ohne aneinanderhaftende Zellen zu trennen und schließlich in 300 ml vorgewärmtes Medium gegeben (RPMI, 10 % fusionsgetestetes FCS, 1 % Glutamax, 2 % HAT-Supplement (50x), 1 mM Natriumpyruvat, 25 µM β-Mercaptoethanol, 1 % Penicillin/Streptomycin). Die Zellsuspension wurde in 15 96-Loch-Platten ausgesät (200 µl pro Loch) und die Platten in Frischhaltefolie 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 10 Tagen wurden die Klone in einem ELISA-Verfahren auf Antikörperproduktion getestet (siehe oben). Positive Klone wurden eingefroren sowie in mehreren Schritten über 2-3 Wochen hinweg von HAT über HT bis hin zu einem Medium ohne Hypoxanthin-Zusätze entwöhnt. Entwöhnte Klone wurden wiederum eingefroren und mehrfach vereinzelt.

Vereinzlung der Hybridome

Hybridome enthalten kurz nach der Fusion ein tetraploides Genom, da sie aus der

Verschmelzung zweier diploider Zellen entstanden sind. In der ersten Zeit nach der Fusion befinden sie sich in einer Konsolidierungsphase. Überflüssige Chromosomen gehen verloren, bis sich die Zellen auf eine Chromosomenzahl einpendeln, die meist leicht über der eines diploiden Satzes liegt. Viele Zellen überleben die Konsolidierung nicht. Überleben die Zellen, bilden sie schon bald eine genetisch heterogene Population, auch wenn sie aus einer Ursprungszelle hervorgegangen sind. Zudem kommt es vor, dass einzelne Zellen die Chromosomen verlieren, die für die Produktion des Antikörpers notwendig sind. Da sie nicht mehr soviel Energie für die Antikörperproduktion benötigen, haben sie einen Wachstumsvorteil gegenüber den antikörperproduzierenden Zellen, und es besteht die Gefahr, dass sie nach kurzer Zeit die Kultur dominieren. Um solche veränderten Zellen zu entfernen und den klonalen Charakter der Population zu erhalten, ist es in den ersten Wochen nach der Fusion wichtig, wertvolle Klone regelmäßig zu vereinzeln.

Die Zellen wurden sorgfältig gezählt und in mehreren Schritten bis auf 5-10 Zellen/ml verdünnt. 200 µl dieser Suspension wurden in die Löcher einer 96-Loch-Platte gegeben. Die Konzentration der Zellen sollte so gewählt werden, dass nur in etwa einem Drittel aller Löcher Klone heranwachsen, um die Wahrscheinlichkeit gering zu halten, dass sich zwei Klone in einem Loch befinden. Nach sieben Tagen wurden die Platten unter dem Mikroskop gesichtet und Löcher mit nur einem heranwachsenden Klon für die weitere Kultur ausgewählt. Nach zehn Tagen wurden die erhaltenen Klone wie oben beschrieben auf Antikörperproduktion hin im ELISA getestet.

4 Ergebnisse

Die Aufnahme apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen löst in der Regel keine Aktivierung der dendritischen Zellen aus, sondern führt in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Systemen zu einer Suppression von Immunität bis hin zu einer Induktion von Toleranz (Savill et al. 2002, Steinman & Nussenzweig 2002). Die Interaktion zwischen Phagozyten und apoptotischen Zellen ist komplex und wird über verschiedene Systeme von Rezeptoren und Adaptermolekülen vermittelt (Übersicht in Lauber et al. 2004). Viele dieser Moleküle vermitteln die Aufnahme der apoptotischen Zelle durch die dendritische Zelle (Übersicht in Krysko et al. 2006). Während diese „Eat-me“-Signale gut untersucht sind, ist über die Moleküle, die ein anti-inflammatorisches Signal an die dendritische Zelle vermitteln, weniger bekannt. Bisher wurden lediglich Phosphatidylserin und die Mer-Tyrosin-Kinase als anti-inflammatorische Moleküle auf apoptotischen Zellen beschrieben (Huynh et al. 2002, Sen et al. 2007). In unserer Arbeitsgruppe wurde zudem das intrazelluläre Protein Annexin 1 als ein mögliches anti-inflammatorisches Signal auf apoptotischen Zellen identifiziert (Weyd 2005).

4.1 U937-Zellen als System für die Untersuchung der Aktivierung dendritischer Zellen

Die Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden mit primären humanen dendritischen Zellen durchgeführt. Als experimentelles System wurde ein Kokultur-System mit dendritischen Zellen und apoptotischen Zellen gewählt. In diesem *in vitro*-System kann der Einfluss apoptotischer Zellen auf die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Sekretion des Cytokins Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) durch dendritische Zellen untersucht werden.

Die Differenzierung primärer humaner dendritischer Zellen aus peripherem Blut unterliegt jedoch auch nach etablierten Protokollen starken Schwankungen und führt nicht reproduzierbar zu einer Population unreifer Zellen. Zudem stehen die differenzierten Zellen nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung und weisen eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Spendern auf. Daher sollte zunächst eine humane Zelllinie gefunden werden, die charakteristische Eigenschaften humaner dendritischer Zellen besitzt und in ausreichend großem Maßstab kultiviert werden kann. Die Zelllinie sollte wie primäre humane dendritische Zellen eine LPS-abhängige TNF-Sekretion aufweisen und in der Lage sein, apoptotische Zellen zu phagozytieren. Idealerweise sollte die Zelllinie auch die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation besitzen, um

die Auswirkungen der Aufnahme apoptotischer Zellen auf die Interaktion von dendritischen Zellen und T-Zellen untersuchen zu können.

Es wurden KG-1-Zellen, L428-Zellen, Mutz-3-Zellen und U937-Zellen untersucht. Die Zelllinie KG-1 entstammt einer akuten myeloiden Leukämie, bei L-428-Zellen handelt es sich um ein Hodgkin-Lymphom, Mutz-3-Zellen sind aus einer akuten myeloiden-monocytischen Leukämie hervorgegangen und U937-Zellen aus einem histiocytischen Lymphom (Koeffler & Golde 1978, Diehl et al. 1981, Hu et al. 1996, Sundström & Nilsson 1976). KG-1 Zellen phagozytierten nicht und sezernierten kein TNF, während L428-Zellen aufgrund eines inaktiven NFκB-Inhibitors (IκB) eine konstitutive TNF-Sekretion besaßen (Daten nicht gezeigt). Mutz-3-Zellen zeigten die größte phänotypische Ähnlichkeit mit primären dendritischen Zellen (Daten nicht gezeigt), erwiesen sich jedoch aufgrund der aufwändigen und teuren Kultivierung mit Zusatz von Cytokinen als ungeeignet.

U937-Zellen hingegen wuchsen zügig in Suspension und konnten wie in der Literatur beschrieben mit Hilfe des Mitogens Phorbol-Myristoyl-Acetat (PMA) zu adhärenenten Zellen differenziert werden (Minta & Pambrun 1985). Ähnlich wie terminal differenzierte primäre dendritische Zellen teilten sich die differenzierten U937-Zellen nicht mehr und behielten diesen Phänotyp in Kultur einige Tage bei.

Es wurden verschiedene Konzentrationen PMA getestet (Daten nicht gezeigt). Die gewünschten Eigenschaften erreichten die Zellen durch eine zwei- bis viertägige Differenzierung mit 10-100 ng/ml PMA. Die U937-Zellen behielten unter allen Differenzierungsbedingungen ihre runde Zellform bei und zeigten auch nach Aktivierung mit LPS nicht die für dendritische Zellen typische Bildung von dendritenähnlichen Zellfortsätzen (Daten nicht gezeigt).

Nach Aktivierung mit LPS exprimierten differenzierte U937-Zellen CD11c, CD11b, CD83, CD31 sowie CD86, CD80 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche, während CD14 nicht in nennenswertem Maße nachweisbar war (Abb. 4.1A). In diesen Markern glichen sie weitgehend primären humanen dendritischen Zellen. Wie primäre dendritische Zellen sezernierten die U937-Zellen nach Stimulation mit LPS dosisabhängig TNF (Abb. 4.1B) und phagozytierten apoptotische Zellen (Abb. 4.1C). Bereits nach 15 min hatten 60 % der U937-Zellen DiD-gefärbte apoptotische Jurkat-Zellen aufgenommen oder sie zumindest fest gebunden.

Insgesamt wiesen die U937-Zellen im Rahmen des gewählten Untersuchungssystems eine ausreichend hohe Gemeinsamkeit mit primären humanen dendritischen Zellen auf, um sie als Modell-Zelllinie in vorliegender Arbeit zu verwenden.

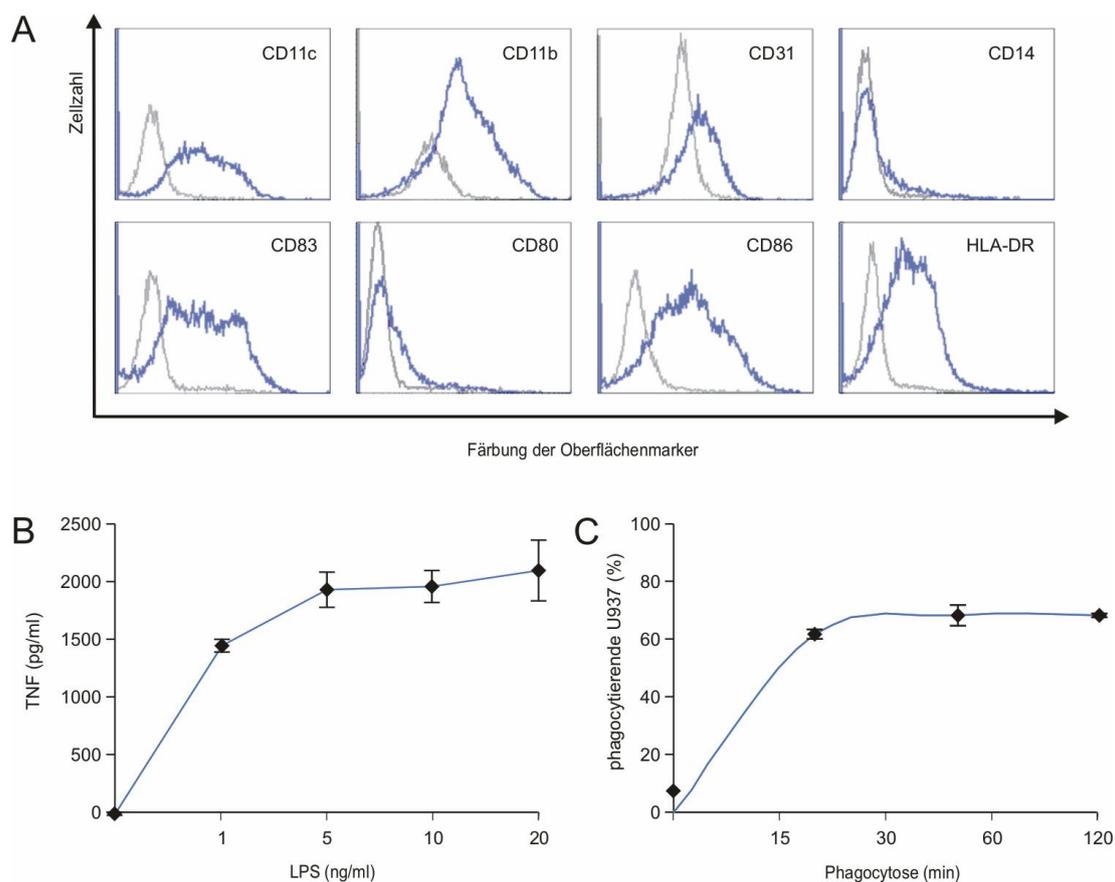


Abbildung 4.1: Charakterisierung der U937-Zellen

A) U937-Zellen wurden mit 10 ng/ml PMA für 2 Tage differenziert und in Bezug auf die angegebenen Oberflächenmarker im Durchflusszytometer analysiert. Graue Linie: undifferenzierte Zellen, blaue Linie: differenzierte Zellen. B) $1 \cdot 10^5$ U937-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen LPS stimuliert. Nach 24 h wurde die Konzentration des sezernierten TNF mittels ELISA bestimmt. C) $2 \cdot 10^5$ U937-Zellen wurden für die angegebenen Zeitspannen mit $5 \cdot 10^5$ DiD-gefärbten apoptotischen Jurkat-T-Zellen inkubiert. Der Prozentsatz der DiD-gefärbten U937-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

4.2 Apoptotische Zellen hemmen zellkontaktabhängig die TNF-Sekretion von U937-Zellen

Um die Interaktion zwischen U937-Zellen und apoptotischen Zellen zu untersuchen, wurden Kokultur-Experimente durchgeführt. Ein Schema des experimentellen Ablaufs ist in Abbildung 4.2A dargestellt.

Als apoptotische Zellen dienten am Vortag isolierte primäre humane neutrophile Granulozyten sowie UV-C-bestrahlte Jurkat-T-Zellen. Neutrophile Granulozyten sind kurzlebige Zellen, die im Körper nur ein Alter von wenigen Tagen erreichen und nach ihrer Isolation aus peripherem Blut spontan über 2-3 Tage hinweg apoptotisch sterben. Am ersten Tag nach der Isolation hatten die Zellen bereits Phosphatidylserin externalisiert, die Zellmembran war jedoch noch intakt. Jurkat-T-Zellen wiesen zwei

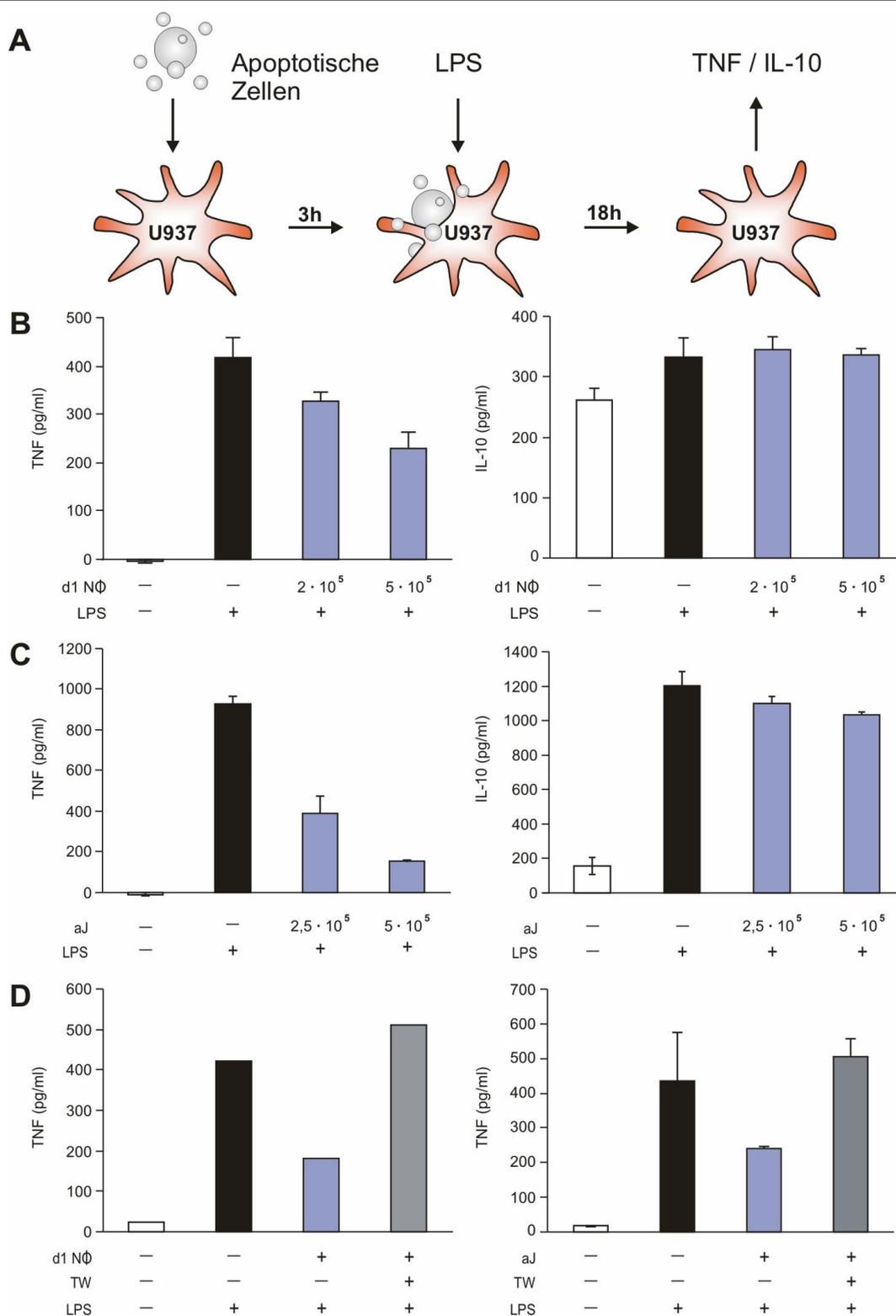


Abbildung 4.2: Apoptotische Zellen hemmen die TNF-Sekretion von U937-Zellen

A) Schema des Versuchsaufbaus. B, C) $1 \cdot 10^5$ U937-Zellen wurden mit der angegebenen Menge apoptotischer Neutrophiler (d1 NΦ, B) bzw. apoptotischer Jurkat-T-Zellen (aJ, C) inkubiert und 3 h später mit 20 ng/ml (B) bzw. 2,5 ng/ml LPS (C) stimuliert. Die Messung der Cytokine im Überstand erfolgte mittels ELISA. D) $2 \cdot 10^5$ U937-Zellen wurden mit $1 \cdot 10^6$ apoptotischen Neutrophilen bzw. $2 \cdot 10^5$ apoptotischen Jurkat-T-Zellen direkt oder in einem $0,1 \mu\text{m}$ Transwell-Einsatz (TW) inkubiert und 3 h später mit 10 ng/ml bzw. 1 ng/ml LPS stimuliert. Die Messung der Cytokine im Überstand erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Stunden nach der Bestrahlung mit 50 mJ/cm^2 UV-C einen vergleichbaren frühapoptotischen Phänotyp auf (Daten nicht gezeigt). Dieses Stadium der Apoptose wurde bewusst gewählt, da zu diesem Zeitpunkt charakteristische Prozesse der Apoptose wie morphologische Veränderungen und Aktivierung von Caspasen bereits eingesetzt haben, intrazelluläre Bestandteile der Zelle jedoch noch nicht nach außen gelangt sind. Daher lassen sich die in diesem Stadium beobachteten Effekte von den Effekten nekrotischer Zellen mit beschädigter Membran abgrenzen (Weyd 2005).

Die von Experiment zu Experiment verschiedenen LPS-Konzentrationen in dieser und allen weiteren Abbildungen erklären sich durch den langsamen Aktivitätsverlust des gelagerten LPS sowie durch eine kulturbedingte Variation in der Sensitivität der verwendeten Zellen. Es wurden Konzentrationen im linearen Bereich der regelmäßig erstellten LPS-Titrationskurve verwendet.

U937-Zellen wurden mit apoptotischen Neutrophilen bzw. apoptotischen Jurkat-T-Zellen für drei Stunden inkubiert, bevor sie mit LPS stimuliert wurden. Nach 18-24 Stunden wurden die Konzentrationen der Cytokine TNF und IL-10 im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Sowohl die Kokultur mit apoptotischen Neutrophilen als auch mit apoptotischen Jurkat-T-Zellen führte zu einer dosisabhängig reduzierten TNF-Sekretion der U937-Zellen um bis zu 50 % bzw. 80 % (Abb. 4.2B und 4.2C). Die ebenfalls LPS-induzierte Sekretion von IL-10 war nicht oder nur geringfügig beeinflusst.

Um auszuschließen, dass die reduzierte Menge an TNF auf eine Aufnahme des Cytokins durch apoptotische Zellen zurückzuführen ist, wurden apoptotische Zellen mit rekombinantem TNF inkubiert. Dies führte nicht zu einer Reduktion des TNF, so dass eine Aufnahme des TNF durch apoptotische Zellen unwahrscheinlich ist. Die Zugabe von unbestrahlten, vitalen Jurkat-T-Zellen führte nicht zu einer Hemmung der TNF-Sekretion der U937-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Wurden die apoptotischen Zellen nicht direkt zu den U937-Zellen gegeben, sondern in einem Transwell-Einsatz zugefügt, der über eine permeable Membran den Austausch von Medium und löslichen Faktoren ermöglicht, war die TNF-Sekretion der U937-Zellen nicht beeinflusst (Abb. 4.2D). Die Suppression wurde demnach nicht über lösliche Moleküle wie Cytokine vermittelt, sondern war abhängig vom direkten Kontakt der U937-Zellen mit den apoptotischen Zellen.

Die Daten zeigen, dass apoptotische Zellen spezifisch die TNF-Sekretion der phagozytierenden U937-Zellen beeinflussen, während die Sekretion von IL-10 nicht betroffen ist. Die Suppression ist apoptosespezifisch und zellkontaktabhängig.

4.3 Die Hemmung der TNF-Sekretion wird durch Annexin 1 vermittelt

Die kontaktabhängige Suppression frühapoptotischer Zellen weist auf die Beteiligung eines Moleküls hin, das früh und apoptosespezifisch auf der Oberfläche apoptotischer Zellen zu finden ist und mit der Oberfläche dendritischer Zellen interagiert. Ein möglicher Kandidat für eine solche Interaktion ist das cytosolische Molekül Annexin 1, das früh während der Apoptose durch einen noch ungeklärten Mechanismus auf die Oberfläche transloziert und dort an ebenfalls von innen nach außen translozierte Phosphatidylserin-Moleküle bindet (Abb. 4.3B, Weyd 2005).

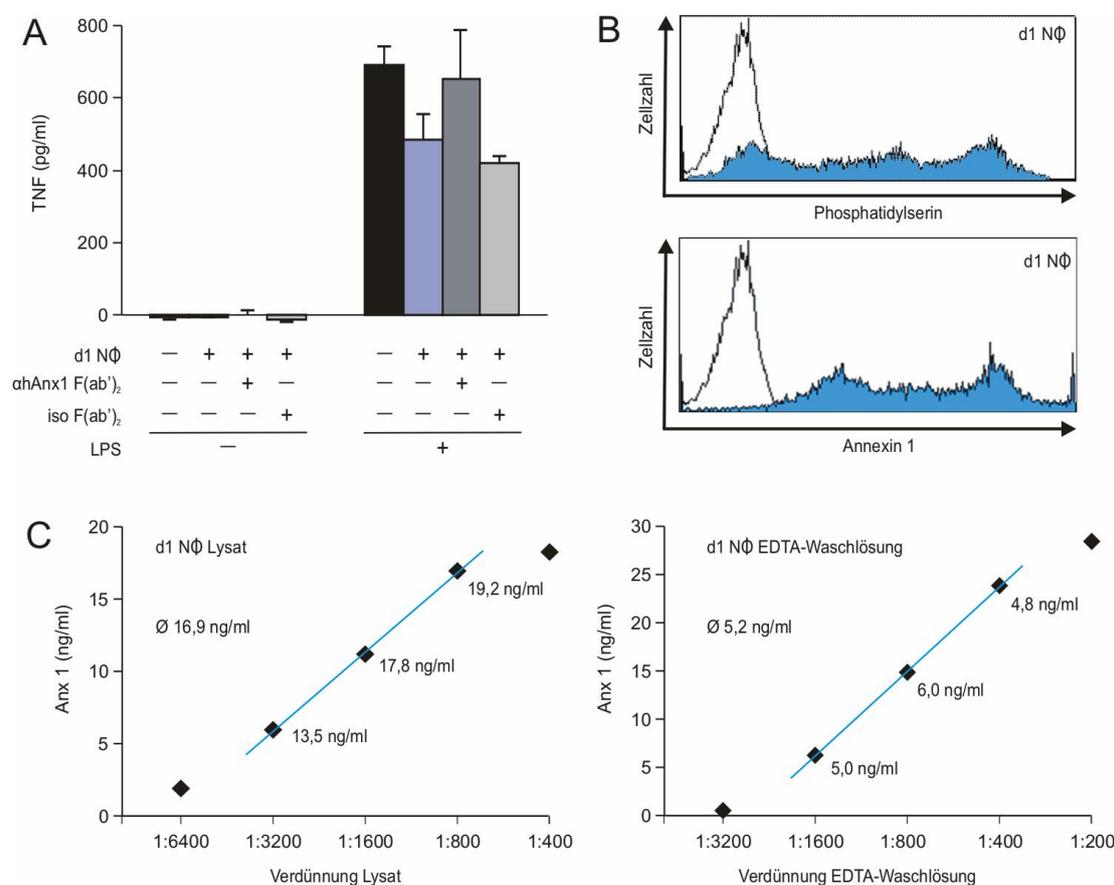


Abbildung 4.3: Die Hemmung der TNF-Sekretion wird durch Annexin 1 vermittelt

A) $5 \cdot 10^5$ apoptotische Neutrophile wurden mit $40 \mu\text{g/ml}$ der angegebenen Antikörper 10 min vorinkubiert und dann zu $1 \cdot 10^5$ U937-Zellen gegeben. 3 h später wurden die U937-Zellen mit 20 ng/ml LPS stimuliert. Die Messung der Cytokine im Überstand erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von Triplikaten an. A) Oberflächenfärbung zur Detektion der Phosphatidylserin- und Annexin 1-Exposition apoptotischer Neutrophiler (d1 NΦ) mit Annexin 5-FITC und DAC5-FITC. C) Für die Bestimmung des Annexin 1-Gehalts im Lysat wurden $1 \cdot 10^6$ apoptotische Neutrophile in $100 \mu\text{l}$ Volumen lysiert und in den angegebenen Verdünnungen im ELISA analysiert. Für die Bestimmung des an die Zelloberfläche translozierten Annexin 1 wurden $1 \cdot 10^7$ apoptotische Neutrophile in $200 \mu\text{l}$ 10 mM EDTA aufgenommen und 10 min inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und die so gewonnene EDTA-Waschlösung in den angegebenen Verdünnungen im ELISA analysiert. Da die Zellen in $100 \mu\text{l}$ lysiert wurden, ergibt sich für 1 Million Zellen ein Annexin 1-Gehalt von $1,69 \mu\text{g}$. Das an die Zelloberfläche translozierte Annexin 1 wurde in $200 \mu\text{l}$ Volumen abgewaschen, es ergibt sich daher ein Wert von $0,1 \mu\text{g}$ für 1 Million Zellen.

Falls Annexin 1 bei diesem Prozess eine Rolle spielt, sollten blockierende, gegen Annexin 1 gerichtete Antikörper einen suppressiven Effekt apoptotischer Zellen verhindern. Um einen Einfluss von Fc-Rezeptoren zu vermeiden, wurden F(ab')₂-Fragmente eines gegen rekombinantes humanes Annexin 1 generierten polyklonalen Kaninchen-Antikörpers verwendet. Tatsächlich konnten die gegen Annexin 1-gerichteten F(ab')₂-Fragmente die durch apoptotische Neutrophile vermittelte Reduktion der LPS-induzierten TNF-Sekretion von U937-Zellen weitgehend aufheben (Abb. 4.3A).

Um zu untersuchen, wie viel Annexin 1 in apoptotischen Neutrophilen vorhanden ist und wie viele Moleküle während der Apoptose auf die Oberfläche gelangen, wurde ein enzymgekoppelter Immunosorbent-Assay (ELISA) für humanes Annexin 1 entwickelt. Als Primärantikörper diente ein polyklonaler gegen humanes Annexin 1 gerichteter Kaninchen-Antikörper, als Sekundärantikörper wurde der an Biotin gekoppelte monoklonale Antikörper DAC5 verwendet (Weyd 2005). Messungen der Annexin 1-Konzentration in Lysaten von apoptotischen Neutrophilen ergaben einen Annexin 1-Gehalt von etwa 1,7 µg pro Million Neutrophile (Abb. 4.3C). Da die Bindung von Annexin 1 an Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche calciumabhängig ist, kann das externalisierte Annexin 1 mit Hilfe von Puffern, die Calciumchelatoren enthalten, in Lösung gebracht werden. Die Analyse des Annexin 1-Gehaltes in diesen Waschlösungen ergab für eine Million Neutrophile eine Menge von etwa 0,15 µg Annexin 1 (Abb. 4.3C). Für apoptotische CEM-T-Zellen wurden Werte von 5,9 µg pro Million Zellen im Lysat und 2,4 µg auf der Zelloberfläche ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Da Antikörper gegen Annexin 1 die TNF-Suppression apoptotischer Neutrophiler fast vollständig aufheben konnten, stellt Annexin 1 offenbar den hauptsächlichen Vermittler eines anti-inflammatorischen Signals auf der Oberfläche neutrophiler Granulocyten dar. Die Bestimmung der Annexin 1-Menge auf apoptotischen Neutrophilen eröffnete die Möglichkeit, rekombinantes Annexin 1 in „physiologischen“ Konzentrationen in weiteren *in vitro*-Experimenten einzusetzen.

4.4 Annexin hemmt die TNF-Sekretion von U937-Zellen

Da der suppressive Effekt apoptotischer Zellen durch Zugabe eines polyklonalen Antikörper-F(ab')₂-Fragments gegen Annexin 1 weitgehend aufgehoben werden konnte, stellte sich die Frage, ob die TNF-Sekretion der U937-Zellen auch durch rekombinantes Annexin 1 inhibierbar ist. Daher wurden U937-Zellen statt mit apoptotischen Zellen mit löslichem rekombinanten Annexin 1 inkubiert. Ein Schema

des experimentellen Ablaufs ist in Abbildung 4.4A dargestellt.

Die Expression des rekombinanten Annexin 1 erfolgte in *E. coli*-Bakterien. Die in der Präparation enthaltenen Endotoxine wurden nach der Aufreinigung des Proteins durch verschiedene chromatographische Verfahren beseitigt. Das aufgereinigte Protein besitzt eine Größe von 37 kDa im Silbergel (Abb. 4.4B). Das rekombinante Annexin 1 wurde wie die apoptotischen Zellen zu U937-Zellen gegeben, um die Auswirkung auf die LPS-induzierte TNF-Sekretion der U937-Zellen zu untersuchen. Die verwendeten Mengen an rekombinanten Annexin 1 betragen zwischen 0,5 und 10 µg Protein pro 1 Million U937-Zellen und bewegten sich damit im Bereich der für apoptotische Zellen ermittelten Menge an Annexin 1 (Abb. 4.3C).

Bei Zugabe von löslichem Annexin 1 konnte nur eine minimale Reduktion der TNF-Sekretion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da möglicherweise die korrekte räumliche Anordnung mehrerer Annexin 1-Moleküle auf der Oberfläche der apoptotischen Zelle notwendig ist, um ein Signal in den U937-Zellen auszulösen, wur-

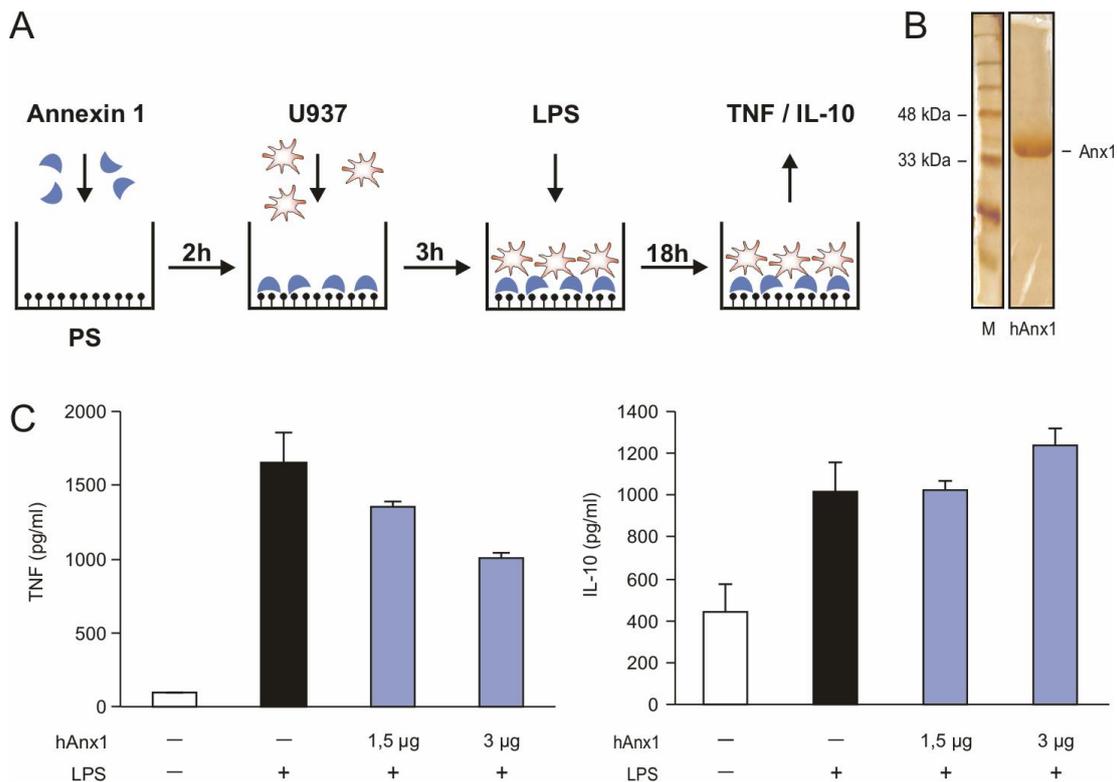


Abbildung 4.4: Rekombinantes Annexin 1 hemmt die TNF-Sekretion von U937-Zellen

A) Schema des Versuchsaufbaus. B) Annexin 1 (Anx1) wurde über chromatographische Verfahren aufgereinigt und mittels SDS-PAGE im Silbergel visualisiert. C) Phosphatidylserin-beschichtete Zellkulturlocher wurden mit der angegebenen Menge an rekombinatem Annexin 1 beschichtet. Nach 2 h wurden $1 \cdot 10^5$ U937-Zellen zugegeben. 3 h später wurden die U937-Zellen mit 1 ng/ml LPS stimuliert, die Messung der Cytokine im Überstand erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

de *in vitro* eine apoptotische Oberfläche simuliert. Zu diesem Zweck wurden Zellkulturplatten mit Phosphatidylserin beschichtet und das rekombinante Annexin 1 an diese Phospholipidschicht gebunden (Abb. 4.4A). Kultivierung der U937-Zellen auf dieser Annexin 1-Oberfläche reduzierte ihre LPS-induzierte TNF-Sekretion um etwa 30 % (Abb. 4.3C). Die Sekretion von IL-10 war nicht beeinflusst. Dies entspricht den in Abb. 4.1 dargestellten Experimenten mit apoptotischen Zellen. Als Kontrolle für das rekombinante Protein wurde in späteren Experimenten denaturiertes Annexin 1 verwendet. Eine mutierte Form des Proteins ist in Vorbereitung. Da durch die Verwendung von Serum im Medium sehr viel Protein vorhanden ist und nur wenig Annexin 1 in einem geringen Volumen eingesetzt wurde, ist ein unspezifischer Effekt jedoch unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass auch das rekombinante Annexin 1 zu einer spezifischen Reduktion der TNF-Sekretion von U937-Zellen führt, bestätigt die Experimente mit den blockierenden Antikörpern (Abb. 4.2B) und lässt den Schluss zu, dass Annexin 1 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals an U937-Zellen spielt.

Dendritische Zellen integrieren Signale aus der Peripherie und wandern nach Aufnahme von Material in den Lymphknoten, wo sie entweder T-Zellen aktivieren oder Toleranz gegenüber den aufgenommenen Antigenen auslösen. Wenn Annexin 1 ein Signal an dendritische Zellen vermittelt, sollte dies die dendritischen Zellen so beeinflussen, dass es zu einer veränderten T-Zell-Antwort kommt. Um zu untersuchen, ob die mit apoptotischen Zellen oder Annexin 1 vorbehandelten U937-Zellen im Vergleich zu unbehandelten U937-Zellen eine veränderte T-Zell-Antwort auslösen, wurden Kokultur-Experimente mit U937-Zellen und primären humanen T-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden U937-Zellen mit LPS stimuliert und anschließend allogene primäre T-Zellen zugegeben. Nach 2-4 Tagen wurde die Proliferation der T-Zellen durch Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin in die DNA bestimmt.

Die U937-Zellen waren grundsätzlich in der Lage, allogene primäre humane T-Zellen zu stimulieren (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation wurde durch Zugabe von stimulierenden, gegen CD28 und CD3 gerichteten Antikörpern zusätzlich verstärkt. Insgesamt war das System jedoch nicht stabil und die Verwendung der Zelllinie machte die Untersuchung einer syngenen T-Zellantwort nicht möglich. Zudem handelt es sich bei dem untersuchten Phänomen um einen komplexen Prozess, der im Organismus in verschiedenen Geweben und unterschiedlichen immunologischen Milieus stattfindet und *in vitro* nicht einfach zu simulieren ist. Um die experimentellen Möglichkeiten zu erweitern, wurde ein analoges Maussystem etabliert.

4.5 Der Antikörper 8D10 erkennt murines Annexin 1

Um murines Annexin 1 nachzuweisen und gegebenenfalls seine biologische Wirkung zu blockieren, wurden gegen murines Annexin 1 gerichtete Antikörper erzeugt. Zwei DBA-Ratten mit einem bakteriell exprimierten Annexin 1-Glutathionsulfonyltransferase (GST)-Fusionsprotein immunisiert und eine Fusion der Milzzellen mit einer murinen Myelom-Zelllinie durchgeführt.

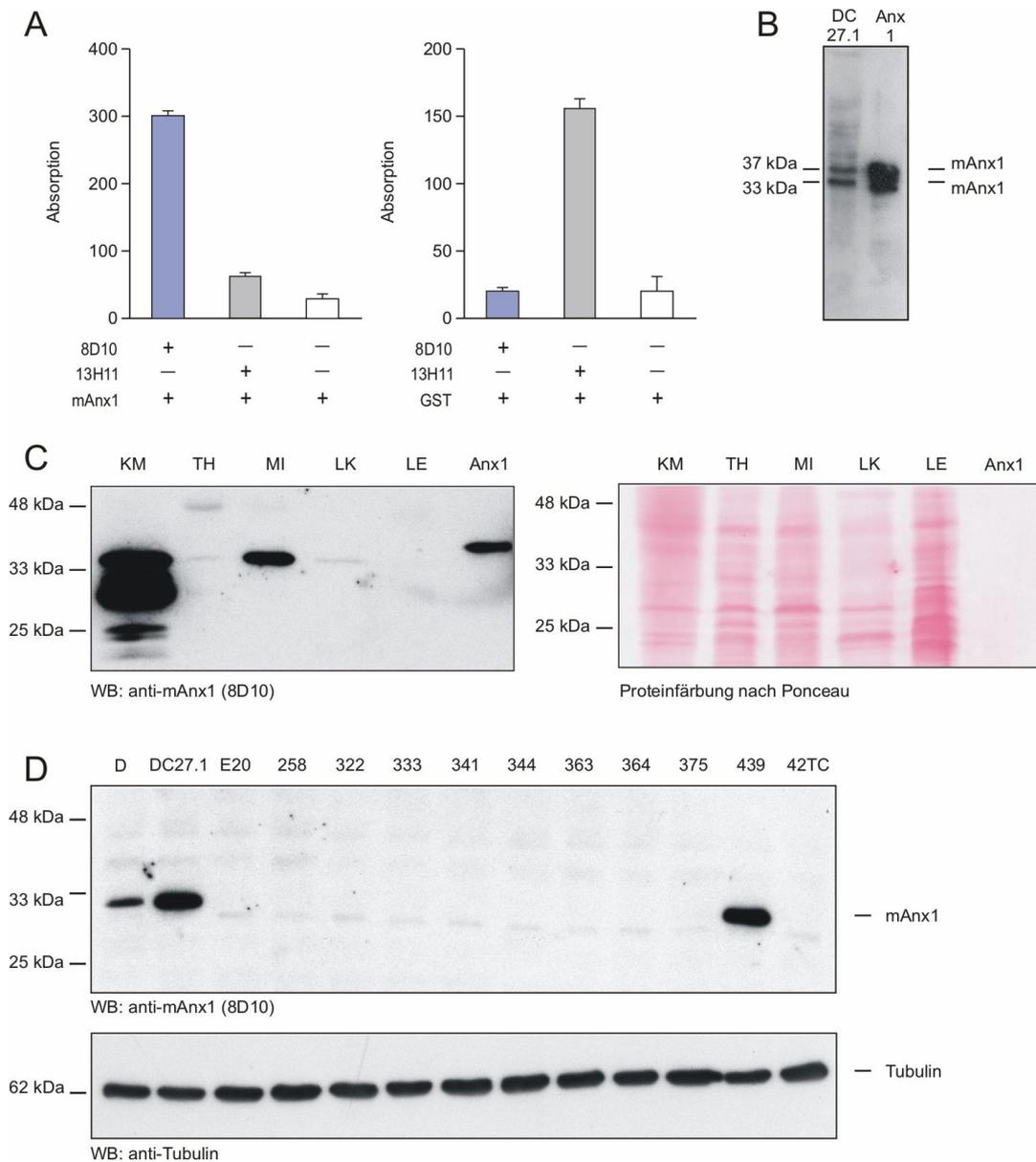


Abbildung 4.5: Der 8D10 Antikörper erkennt murines Annexin 1

A) Rekombinantes murines Annexin 1 (mAnx1) bzw. GST wurde an ELISA-Platten adsorbiert und mit den angegebenen biotinylierten Antikörpern detektiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. B) 8D10 Western Blot mit einem Lysat der murinen Zelllinie DC27.1 und rekombinantem murines Annexin 1. C) Detektion von Annexin 1 in verschiedenen murinen Gewebelysaten mittels Western Blot (links), Proteinfärbung der Membran nach Ponceau als Ladekontrolle rechts), KM: Knochenmark, TH: Thymus, MI: Milz, LK: Lymphknoten, LE: Leber, Anx1: rekombinantes Annexin 1. D) Detektion von Annexin 1 in Lysaten verschiedener muriner Thymom-Zelllinien mittels Western Blot, Detektion von Tubulin als Ladekontrolle.

Die Untersuchung der entstandenen Hybridome auf Annexin 1-spezifische Antikörper erfolgte per ELISA und Western Blot und führte zur Identifizierung eines monoklonalen Annexin 1-bindenden IgG2a Antikörpers (8D10) und einer gegen GST gerichteten Isotypkontrolle (13H11). Der Antikörper 8D10 zeigte im ELISA und im Western Blot eine Bindung sowohl an rekombinantes als auch an endogenes murines Annexin 1. Der Antikörper 13H11 zeigte nur im ELISA eine Bindung an rekombinantes GST (Abb. 4.5A, 4.5B).

Mit Hilfe des 8D10-Antikörpers konnte die Expression von murinem Annexin 1 in verschiedenen hämatopoetischen Geweben nachgewiesen werden (Abb. 4.5C). Eine starke Expression fand sich im Knochenmark und in der Milz. Lymphknoten und Thymus wiesen eine schwache Expression auf. In der Leber war keine Expression von Annexin 1 detektierbar (Abb. 4.5C). Als zuverlässigste Ladekontrolle erwies sich eine Gesamtfärbung der Proteine auf der Membran nach Ponceau, da die unterschiedlichen Gewebe abweichende Expressionen allgemein verwendeter Kontrollproteine wie Erk oder Tubulin aufwiesen. Die Expression von murinem Annexin 1 konnte ebenfalls in primären murinen dendritischen Zellen und den murinen Makrophagen-Zelllinien J774.A1 und Raw 264.7 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die geringe Expression im Thymus war unerwartet, da im menschlichen Thymus bei CD4+/CD8+ Thymocyten eine Externalisierung von Annexin 1 nachgewiesen werden konnte (Weyd 2005). Die Untersuchung verschiedener muriner Thymome führte jedoch zur Identifizierung positiver und negativer Zelllinien (Abb. 4.5D). Es lässt sich daher spekulieren, dass auch in der Maus Annexin 1 von T-Zellvorläufern in bestimmten Phasen der thymischen Selektion exprimiert wird.

Der monoklonale, gegen murines Annexin 1 gerichtete Antikörper 8D10 ermöglicht weitergehende Untersuchungen zur Expression des Proteins in der Maus und eröffnet Möglichkeiten für den Einsatz in zellulären *in vitro*-Experimenten.

4.6 Apoptotische Milzzellen hemmen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

Um zu überprüfen, ob die mit U937-Zellen und menschlichen apoptotischen Zellen gewonnenen Ergebnisse auf das Maussystem übertragbar sind, wurden Kokulturerperimente mit primären murinen dendritischen Zellen und apoptotischen murinen Milzzellen durchgeführt.

Die dendritischen Zellen wurden als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark isoliert und mit rekombinantem GM-CSF oder GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand zu

unreifen dendritischen Zellen differenziert. An Tag 6 nach der Differenzierung mit rekombinantem GM-CSF zeigten die Zellen eine Expression von CD11c, CD11b, CD83, MHC II und CD86. Der Makrophagen-Marker F4/80 war nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Mit GM-CSF-Überstand differenzierte dendritische Zellen wiesen eine höhere Expression von CD83, CD86 und MHC II auf und exprimierten zusätzlich CD40 (Daten nicht gezeigt). Als apoptotische Zellen wurden apoptotische Milzzellen verwendet, die bereits als toleranzinduzierend beschrieben wurden (Ferguson et al. 2002). Da durch UV-Licht in diesen Zellen keine Apoptose induziert werden konnte, wurden die Zellen mit geringen Dosen radioaktiver γ -Strahlung behandelt. Diese Behandlung führte zu einer langsamen Apoptose, so dass die Zellen am folgenden Tag als frühapoptotische, Annexin 5-positive Zellen für das Experiment eingesetzt werden konnten.

Die Inkubation mit apoptotischen Zellen reduzierte die TNF-Sekretion der primären murinen dendritischen Zellen um etwa 50 % (Abb. 4.6A). Die Analyse weiterer Cytokine wurde mittels Bioplex-Analyse vorgenommen. Diese Technik ermöglicht über eine Kombination aus spezifischen Antikörpern und verschiedenfarbigen Kunststoff-Kügelchen die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Cytokine aus demselben Überstand. Die TNF-Messung im Bioplex-Verfahren zeigte ebenfalls eine Suppression der Cytokinsekretion um ca. 50 % (Daten nicht gezeigt). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern. In der Bioplex-Messung wurden neben TNF die Cytokine IL-1 β , IL-12 (p70), IL-10 und IL-13 bestimmt. Die Kokultur mit apoptotischen Zellen führte zu einer Reduktion der IL-1 β - und IL-12 (p70)-Sekretion der dendritischen Zellen um 85 % bzw. 75 %. IL-10 wurde in diesem Experiment nicht sezerniert, die Sekretion von IL-13 wurde nicht beeinflusst (Abb. 4.6A). Die Bioplex-Analyse zeigt, dass die Kokultur mit apoptotischen Zellen zu einer generellen Reduktion der Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine durch die dendritischen Zellen führte. Zudem handelte es sich nicht um eine unspezifische Abschaltung aller Signalwege, da die Sekretion von IL-13 nur geringfügig und nicht systematisch verändert war.

Der anti-inflammatorische Effekt der apoptotischen Milzzellen konnte nur geringfügig durch die Zugabe des gegen murines Annexin 1 gerichteten Antikörpers 8D10 aufgehoben werden (Abb. 4.6B). Im FACS färbt der 8D10-Antikörper apoptotische Maus-Zellen jedoch nur schwach (Daten nicht gezeigt) und Untersuchungen zur Bestimmung des vom Antikörper erkannten Epitops deuten darauf hin, dass der Antikörper an die membranzugewandte Seite des Annexin 1-Moleküls bindet (Frey 2007). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Antikörper im vorliegenden Experiment nur in geringem Maße binden und darüber hinaus aufgrund der Bindestelle eine

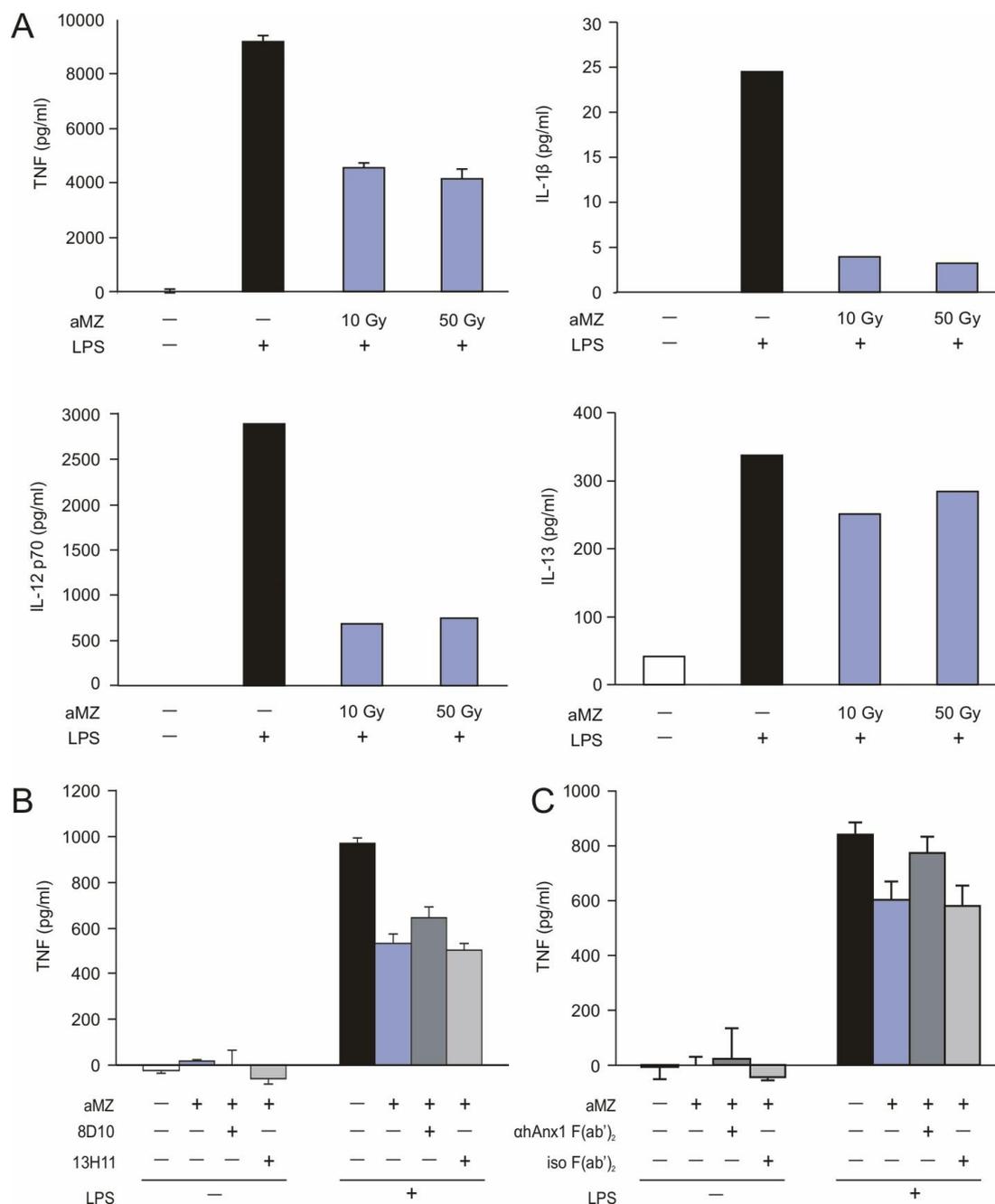


Abbildung 4.6: Apoptotische Milzzellen hemmen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

A) $1 \cdot 10^5$ primäre, mit rekombinantem GM-CSF differenzierte murine dendritische Zellen wurden mit der angegebenen Anzahl apoptotischer Milzzellen (aMZ) inkubiert und 4 h später mit 50 ng/ml LPS stimuliert. Die Messung der Cytokine erfolgte mittels ELISA (TNF) bzw. Bioplex-Analyse (IL-1 β , IL-12, IL-13). B) Wie A, die apoptotischen Milzzellen (Bestrahlung 1 Gy) wurden vor der Zugabe einige min mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Die Endkonzentration der Antikörper betrug 40 μ g/ml (LPS: 5 ng/ml). Die Messung der Cytokine erfolgte mittels ELISA. C) Wie B, statt der monoklonalen Antikörper wurden F(ab)₂-Fragmente polyklonale Antikörper gegen humanes Annexin 1 verwendet (LPS: 20 ng/ml).

Interaktion der aktiven Domäne des Annexin 1-Moleküls mit einem möglichen Rezeptor nicht blockieren konnte. Die Zugabe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen rekombinantes Annexin 1 führte jedoch zu einer Aufhebung der

durch apoptotische Milzzellen verursachten Suppression der murinen dendritischen Zellen (Abb. 4.6C). Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit rekombinantem humanen Annexin 1 erzeugt, ist jedoch mit murinem Annexin 1 kreuzreaktiv. Die Inkubation von murinen dendritischen Zellen mit apoptotischen humanen Neutrophilen führte ebenfalls zu einer Suppression der TNF-Sekretion um 30 %, die durch die Zugabe des polyklonalen Antikörpers wieder aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine Suppression der TNF-Sekretion muriner dendritischer Zellen konnte auch bei der Kokultur mit apoptotischen humanen Jurkat-T-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Daten zeigen, dass auch murine apoptotische Zellen einen anti-inflammatorischen Effekt auf primäre murine dendritische Zellen ausüben. Dieser Effekt kann durch polyklonale Antikörper gegen Annexin 1 weitgehend aufgehoben werden. Annexin 1 ist offenbar auch in diesem System ein hauptsächlicher Vermittler des anti-inflammatorischen Signals. Auch menschliche apoptotische Zellen hemmen die TNF-Sekretion muriner dendritischer Zellen. Da menschliches und murines Annexin 1 auf Aminosäure-Ebene zu 88 % homolog sind, ist es wahrscheinlich, dass auch humane apoptotische Zellen ein Annexin 1-Signal an murine dendritische Zellen vermitteln können.

4.7 An Phosphatidylserin gebundenes Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

Um zu untersuchen, ob auch im Maus-System rekombinantes Annexin 1 die pro-inflammatorische Cytokinsekretion dendritischer Zellen hemmt, wurde rekombinantes murines Annexin 1 an eine Phosphatidylserin-Oberfläche gebunden (vergleiche Schema in Abb. 4.4A). Das rekombinante murine Annexin 1 (Abb. 4.7A) wurde wie das humane Protein in *E. coli*-Bakterien exprimiert und über Affinitätschromatographie von Endotoxinen befreit.

Das rekombinante murine Annexin 1 reduzierte die TNF-Sekretion der murinen dendritischen Zellen um bis zu 75 %. Die Suppression nahm mit steigender Konzentration des eingesetzten LPS ab. In diesem Versuchsaufbau wurde stets eine hohe TNF-Sekretion auch ohne Zugabe von LPS beobachtet, die möglicherweise durch das direkte Umsetzen der empfindlichen dendritischen Zellen auf die Annexin 1-beschichtete Phosphatidylserin-Oberfläche hervorgerufen wurde.

Die pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 β und IL-12 (p70) zeigten ein ähnliches Sekretionsmuster wie TNF (Abb. 4.7B). In diesem Experiment ließen sich geringe

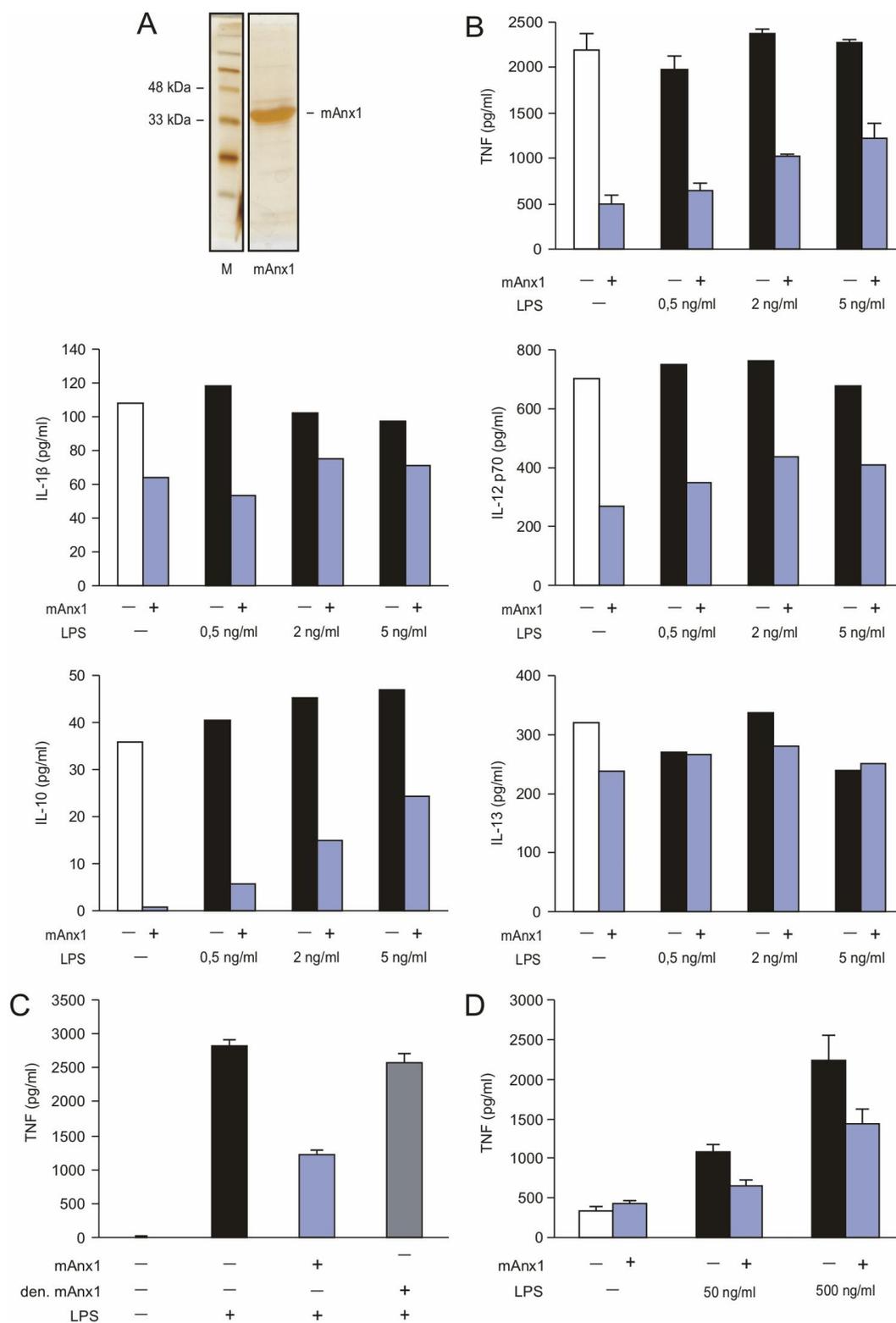


Abbildung 4.7: An Phosphatidylserin gebundenes Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

A) Silbergel des verwendeten murinen Annexin1 (mAnx1). B) Phosphatidylserin-beschichtete Zellkulturlöcher wurden mit 5 μ g rekombinantem Annexin 1 beschichtet und $1 \cdot 10^5$ primäre mit rekombinantem GM-CSF differenzierte murine dendritische Zellen nach 2 h zugegeben. 3 h später wurden die Zellen mit der angegebenen Konzentration LPS stimuliert, die Messung der Cytokine im Überstand erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen von Triplikaten an. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. C) Wie B, denaturiertes Annexin 1 wurde vor dem Experiment 10 min bei 90°C erhitzt. D) Wie B, statt der primären murinen dendritischen Zellen wurden primäre, mit M-CSF differenzierte murine Makrophagen verwendet.

Mengen IL-10 nachweisen, die in einem den pro-inflammatorischen Cytokinen vergleichbaren Muster sezerniert wurden. Die Sekretion von IL-13 wurde durch die Zugabe von Annexin 1 nicht beeinflusst.

Als zusätzliche Kontrolle wurde rekombinantes Annexin 1 verwendet, das durch 10-minütige Inkubation bei 90°C denaturiert worden war. In diesem Fall wurde keine Reduktion der TNF-Sekretion beobachtet (Abb. 4.7C). Die Sekretion von IL-13 war nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Da der Puffer, in dem das Annexin 1 auf die Phosphatidylserin-Oberfläche gegeben wird, vor Zugabe der Zellen entfernt wird, würde ein Verlust der Phosphatidylserin-Bindungsfähigkeit in diesem Experiment zu einem Wegwaschen des Proteins führen. Die Denaturierung bewirkte offenbar entweder einen Verlust der Phosphatidylserin-Bindungsfähigkeit, einen Verlust der anti-inflammatorischen Funktion oder den Verlust beider Eigenschaften.

Die Reduktion der pro-inflammatorischen Cytokinsekretion beschränkte sich nicht auf dendritische Zellen, sondern konnte auch bei primären murinen Makrophagen nachgewiesen werden, die durch M-CSF aus Knochenmark-Vorläuferzellen differenziert worden waren (Abb. 4.7D). Da Makrophagen in noch stärkerem Maße als dendritische Zellen an der Beseitigung apoptotischen Materials beteiligt sind, entspricht es der Erwartung, dass auch sie anti-inflammatorischen Signalen gegenüber empfänglich sind.

PS-gebundenes rekombinantes Annexin 1 führt auch bei primären murinen dendritischen Zellen zu einer spezifischen Reduktion der TNF-Sekretion. Die Suppression kann durch hohe Dosen LPS aufgehoben werden. Der Effekt beschränkt sich nicht nur auf dendritische Zellen, sondern kann auch bei Makrophagen beobachtet werden.

4.8 Lösliches Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

Um eine Aktivierung der dendritischen Zellen durch die direkte Zugabe auf eine Phosphatidylserin-Oberfläche zu vermeiden und im Falle des denaturierten Annexin 1 zwischen einem Verlust der Phosphatidylserin-Bindung und einem Verlust der anti-inflammatorischen Aktivität zu unterscheiden, wurden Experimente mit löslichem Annexin 1 durchgeführt. Tatsächlich ließ sich die TNF-Sekretion primärer muriner dendritischer Zellen im Gegensatz zu den Experimenten mit U937-Zellen durch lösliches Annexin 1 um 30-50 % unterdrücken (Abb. 4.8A). Möglicherweise reagieren die primären dendritischen Zellen empfindlicher auf Annexin 1 als die U937-Zellen. Die Sekretion von IL-1 β und IL-12 (p70) wurde ebenfalls durch Annexin 1 supprimiert,

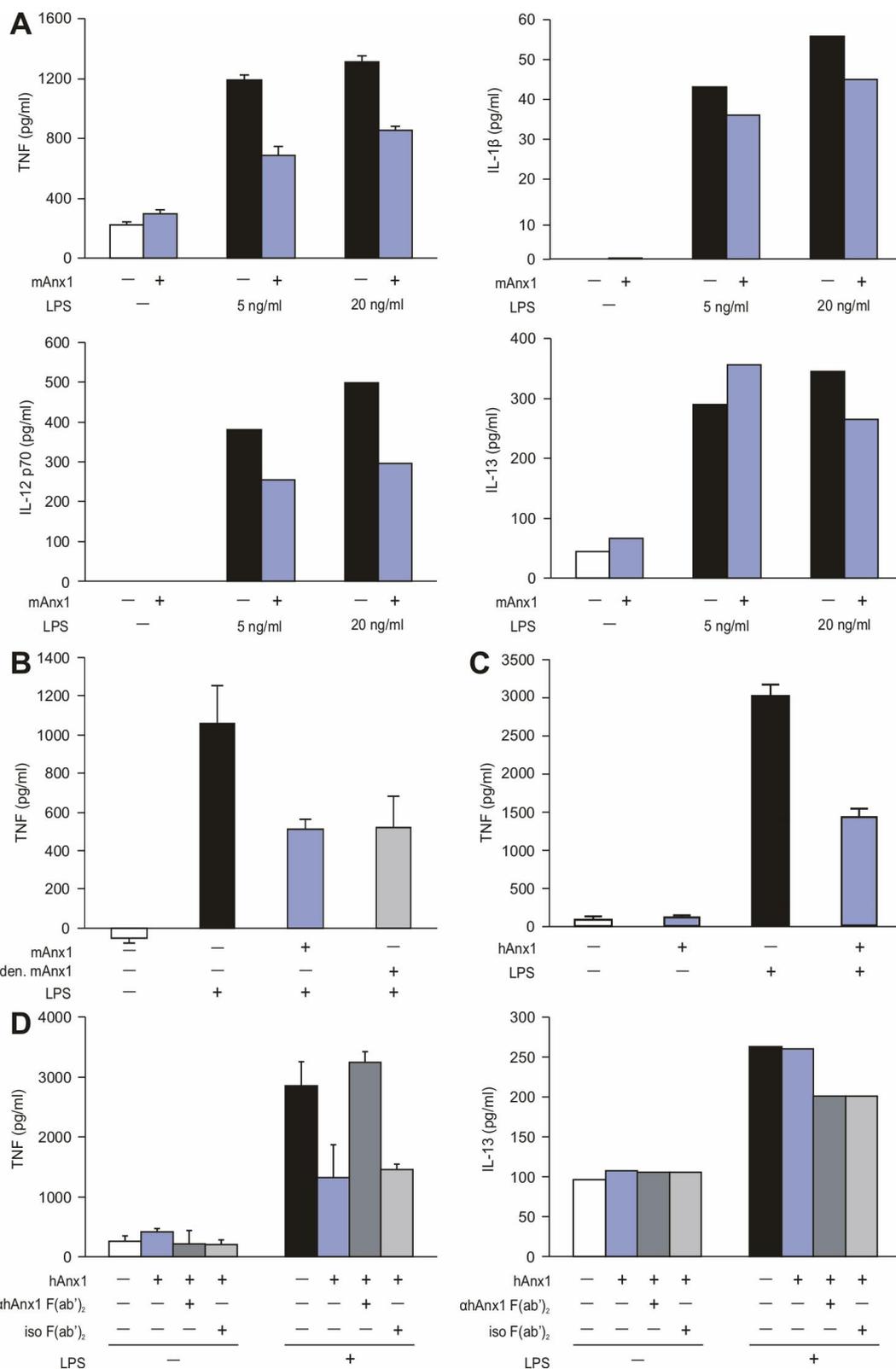


Abbildung 4.8: Lösliches Annexin 1 hemmt die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen

A) $1 \cdot 10^5$ primäre mit rekombinantem GM-CSF differenzierte murine dendritische Zellen wurden mit 5 $\mu\text{g/ml}$ löslichem murinen Annexin 1 inkubiert und 4 h später mit der angegebenen LPS-Konzentration stimuliert. Die Messung der Cytokine erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. B) Wie A, denaturiertes Annexin 1 wurde vor dem Experiment 10 min bei 90°C erhitzt (LPS: 1ng/ml). C) Wie A, statt des murinen wurde humanes Annexin 1 verwendet

(LPS: 1 ng/ml). D) Wie C, es wurden 40 µg/ml der angegebenen F(ab)₂-Fragmente eingesetzt (LPS: 4 ng/ml).

die Sekretion von IL-13 war wiederum nicht systematisch beeinträchtigt (Abb. 4.8A). Eine LPS-unabhängige Aktivierung der dendritischen Zellen trat in diesem Versuchsaufbau nicht mehr auf.

Als Kontrolle diente wiederum Annexin 1, das 10 min bei 90°C denaturiert worden war. Wurde es in löslichem Zustand zu den dendritischen Zellen gegeben, vermochte es in gleichen Maße wie das native Protein die TNF-Sekretion zu inhibieren (Abb. 4.8B). Die Sekretion von IL-13 war nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Es kann daher geschlossen werden, dass die Aufhebung des Effektes in Abbildung 4.7C auf einen Verlust der Phosphatidylserin-Bindung zurückzuführen ist und dass das Annexin 1 in diesem Experiment vor Zugabe der Zellen mit dem Entfernen des Puffers gewaschen wurde.

Die TNF-Sekretion primärer muriner dendritischer Zellen konnte auch durch rekombinantes humanes Annexin 1 supprimiert werden (Abb. 4.8C). Das humane Annexin 1-Molekül ist offenbar in der Lage, auch auf murine dendritische Zellen einen Effekt auszuüben (vergleiche Abb. 4.6D). Der inhibierende Effekt des humanen Annexin 1 auf die TNF-Sekretion muriner dendritischer Zellen konnte durch die Zugabe polyklonaler gegen Annexin 1 gerichteter Antikörper aufgehoben werden. Die Sekretion von IL-13 wurde sowohl von dem Annexin 1-spezifischen F(ab')₂-Fragment als auch von der Isotypkontrolle in gleichem Maße nur geringfügig beeinflusst (Abb. 4.8D).

Sowohl murines als auch humanes Annexin 1 besitzen einen supprimierenden Effekt auf die pro-inflammatorische Cytokinsekretion muriner dendritischer Zellen. Dieser Effekt wird durch eine aktive Domäne vermittelt, die durch Denaturierung nicht beeinträchtigt wird, und ist durch Antikörper gegen Annexin 1 aufhebbar.

4.9 Annexin reduziert die Expression kostimulatorischer Moleküle auf murinen dendritischen Zellen

Der Aktivierungsstatus dendritischer Zellen und ihre Rolle bei der T-Zell-Stimulation hängen nicht nur von den sezernierten Cytokinen ab, sondern auch von der Expression der MHC-Moleküle und kostimulatorischer Moleküle wie CD86 oder CD40. Um zu untersuchen, ob die Interaktion der dendritischen Zellen mit Annexin 1 zu einer veränderten Expression dieser Moleküle führt, wurden mit Annexin behandelte und mit LPS stimulierte murine dendritische Zellen zwei Tage nach Zugabe von LPS im Durchflusszytometer analysiert. Ein Schema des Versuchsaufbaus ist in Abb. 4.9A dargestellt.

Die Behandlung der dendritischen Zellen mit Annexin 1 führte in einigen Experimenten zu einer leichten Zunahme und in anderen Experimenten zu einer leichten Abnahme der Expression von MHC II-Molekülen. In den meisten Experimenten blieb die Expression unverändert (Abb. 4.9B). Eine reproduzierbare Abnahme der Expression nach Annexin 1-Behandlung konnte für die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 beobachtet werden (Abb. 4.9B). Diese Ergebnisse lassen

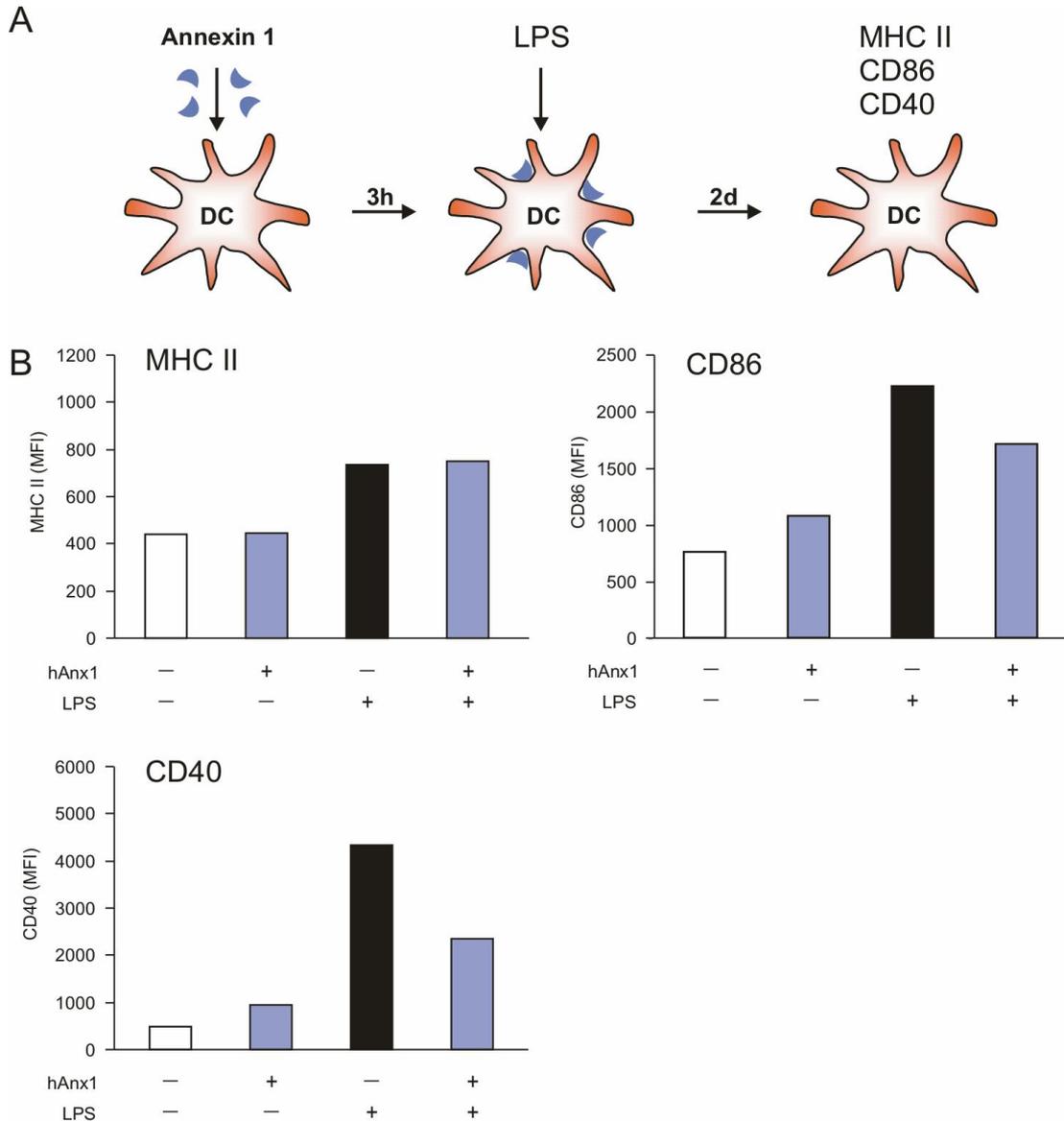


Abbildung 4.9: Annexin reduziert die Expression kostimulatorischer Moleküle auf murinen dendritischen Zellen

A) Schema des Versuchsaufbaus. B) $1 \cdot 10^5$ primäre murine dendritische Zellen wurden mit rekombinatem humanen Annexin 1 inkubiert und 4 h später mit 500 ng/ml LPS stimuliert. MHC II, CD40: mit GM-CSF-Überstand differenzierte dendritische Zellen, 500 ng/ml LPS. CD86: mit rekombinatem GM-CSF differenzierte dendritische Zellen, 1 ng/ml LPS. Nach 24 h wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst, die Triplikate vereinigt, mit Antikörpern gegen MHC II, CD86 und CD40 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Färbungen. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

vermuten, dass die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation unverändert ist, während ihre Fähigkeit zur kostimulatorischen Aktivierung von T-Zellen durch die Behandlung mit Annexin 1 vermindert wurde.

Annexin 1 übt folglich nicht nur einen unmittelbaren Einfluss auf dendritische Zellen aus, der sich in einer verminderten Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine widerspiegelt. Die reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle zeigt, dass es sich um eine stabile Veränderung des Phänotyps der dendritischen Zellen handelt.

4.10 Mit apoptotischen Zellen kokultivierte dendritische Zellen hemmen die Proliferation und IFN- γ -Produktion von T-Zellen

Dendritische Zellen nehmen Antigen in der Peripherie auf und wandern in die Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen interagieren können. Der Aktivierungsstatus der dendritischen Zellen entscheidet darüber, ob eine Immunantwort ausgelöst wird oder ob es zur Induktion von Toleranz kommt. Um zu untersuchen, ob die von apoptotischen Zellen induzierten phänotypischen Veränderungen der dendritischen Zellen zu einer veränderten Stimulation von T-Zellen führen, wurde ein Kokultur-System mit dendritischen Zellen und syngenen OT-II T-Zellen etabliert. OT-II-T-Zellen besitzen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der ein präsentierte Peptid aus Hühneralbumin (Ovalbumin) erkennt. Das Antigen kann den dendritischen Zellen in löslicher Form zugegeben werden. Diese nehmen das Protein durch Mikropinocytose auf und prozessieren es für die Präsentation in MHC I und MHC II. Die OT-II-T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten einer transgenen Maus über eine negative Zellsortierung aufgereinigt. Ein Schema des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 4.10A dargestellt.

Abbildung 4.10B zeigt die TNF-Sekretion der verwendeten dendritischen Zellen. Bei Inkubation der dendritischen Zellen mit apoptotischen Zellen ist die Sekretion von TNF vermindert. Die zwei Tage nach dem LPS-Stimulus zugegebenen CFSE-gefärbten OT-II-T-Zellen wurden drei weitere Tage später der Kokultur entnommen und ihre Proliferation im Durchflusszytometer untersucht. Die Sekretion von IFN- γ wurde im ELISA gemessen. Vor Zugabe der T-Zellen war kein IFN- γ im Kulturüberstand der dendritischen Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). T-Zellen, die mit Annexin 1-behandelten dendritischen Zellen kokultiviert wurden, proliferierten zu einem geringeren Prozentsatz (Abb. 4.10C) und sezernierten weniger IFN- γ als die Kontroll-T-Zellen (Abb. 4.10D). Die Proliferation und auch die IFN- γ -Sekretion der T-Zellen ist nicht vollständig gehemmt. Diese partielle Suppression entspricht der partiellen Suppression der dendritischen Zellen auf Cytokinebene und weist möglicherweise auf einen semi-reifen Phänotyp der dendritischen Zellen hin, der in

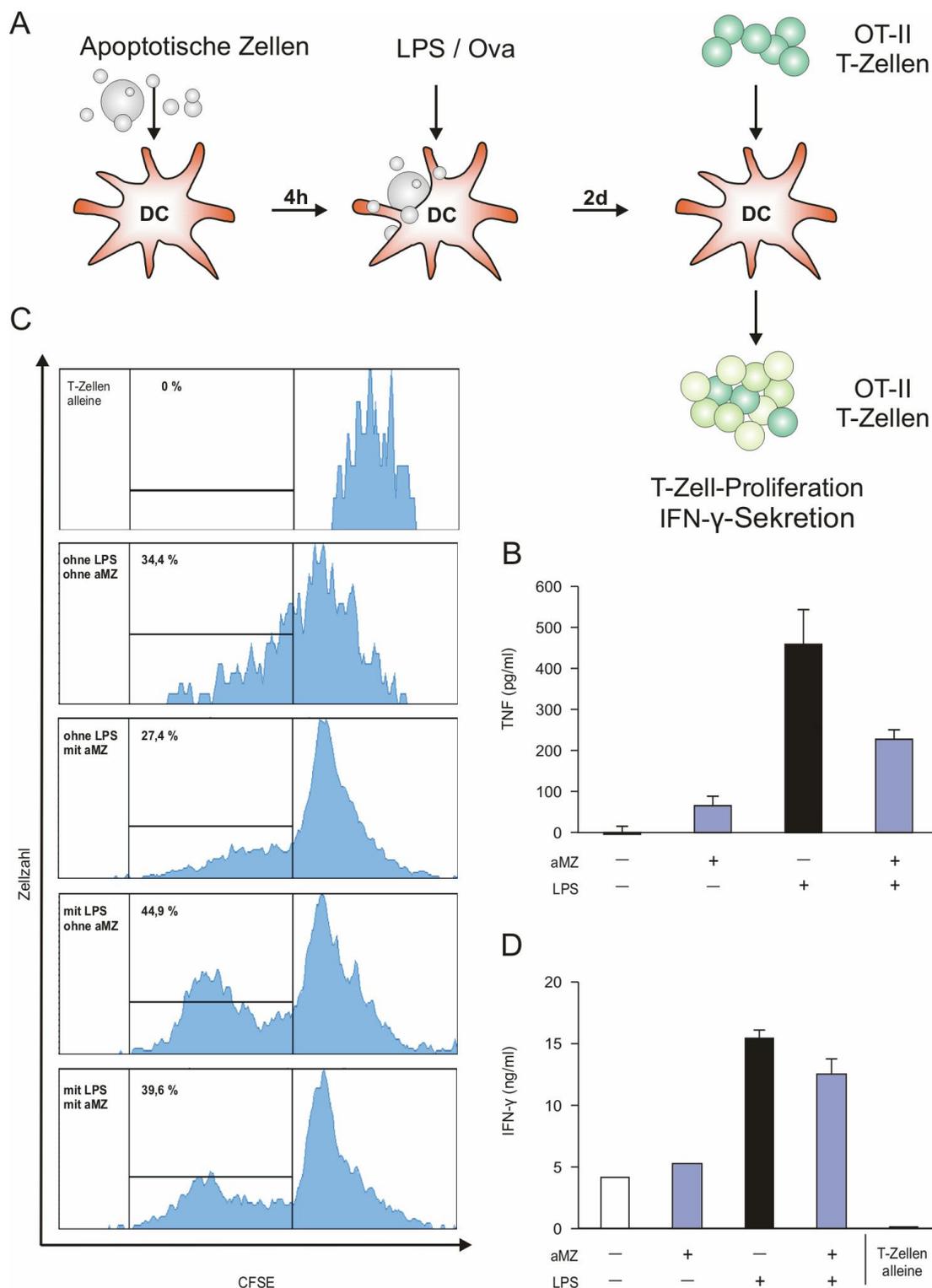


Abbildung 4.10: Apoptotische Milzzellen reduzieren T-Zell-Proliferation und IFN-γ-Sekretion

A) Schema des Versuchsablaufs. B) $1 \cdot 10^5$ primäre mit rekombinantem GM-CSF differenzierte murine dendritische Zellen wurden mit $5 \cdot 10^5$ apoptotischen Milzzellen (aMZ, 1 Gy) inkubiert und 4 h später mit 20 ng/ml LPS stimuliert. Als Antigen wurden 10 µg/ml Ovalbumin zugegeben. Die Messung der TNF-Konzentration im Überstand erfolgte mittels ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. C, D) Zwei Tage später wurden mit CFSE gefärbte OT-II-T-Zellen zugegeben. Nach weiteren drei Tagen wurden die Proliferation der T-Zellen im Durchflusszytometer und die IFN-γ-Produktion im ELISA bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

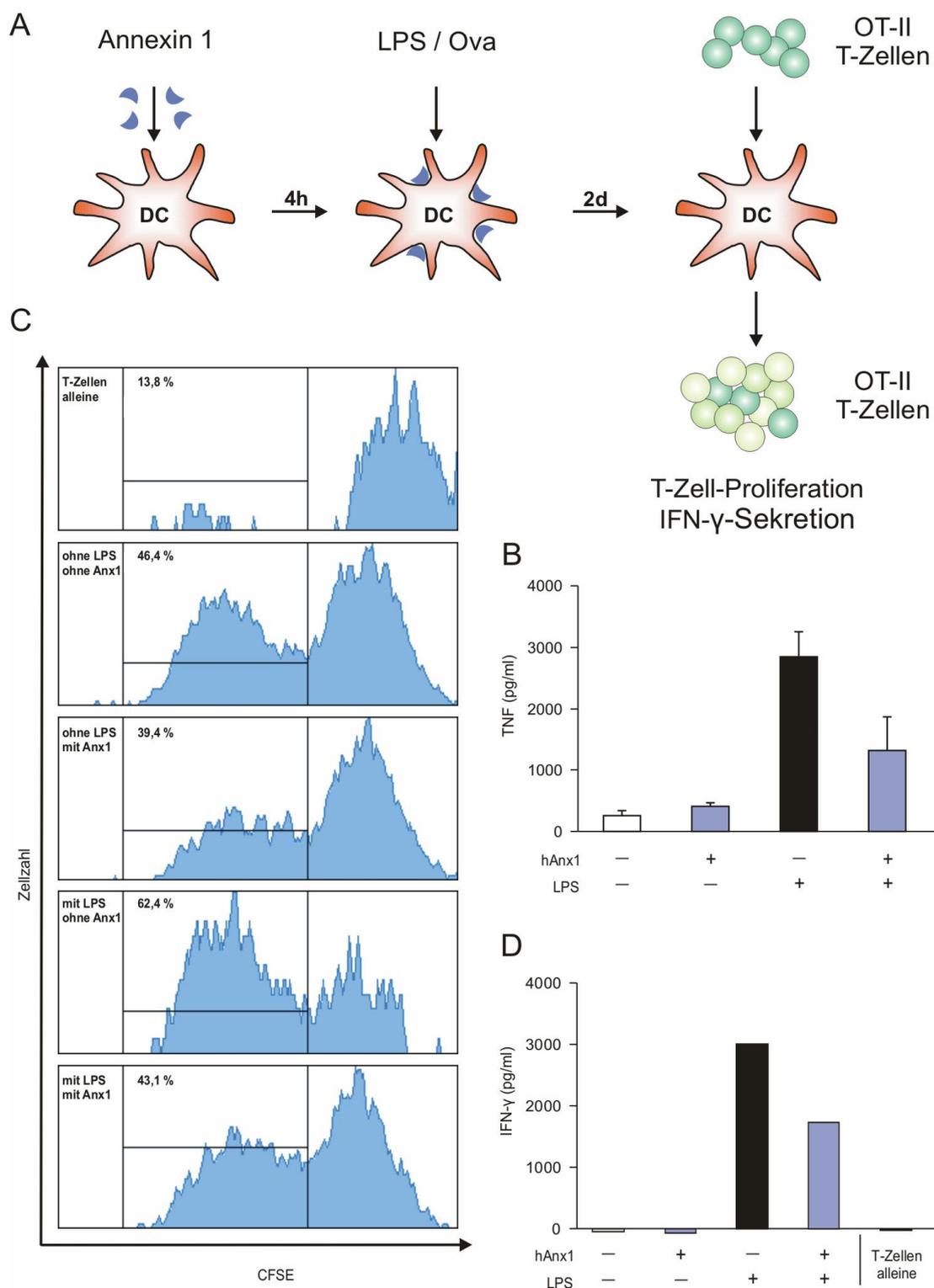


Abbildung 4.11: Annexin 1 reduziert T-Zell-Proliferation und IFN-γ-Sekretion

A) Schema des Versuchsablaufs. B) $1 \cdot 10^5$ primäre mit rekombinantem GM-CSF differenzierte murine dendritische Zellen wurden mit 5 µg/ml löslichem murinem Annexin 1 inkubiert und 4 h später mit 4 ng/ml LPS aktiviert. Als Antigen wurden 10 µg/ml Ovalbumin zugegeben. Die Messung der TNF-Konzentration im Überstand erfolgte durch ELISA. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten an. C, D) Zwei Tage später wurden mit CFSE gefärbte OT-II-T-Zellen zugegeben. Nach weiteren vier Tagen wurden die Proliferation der T-Zellen im Durchflusszytometer und die IFN-γ-Produktion im ELISA bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

verschiedenen Publikationen mit der Induktion von Toleranz in Verbindung gebracht wurde (Übersicht in Lutz & Schuler 2002). Insbesondere die verringerte Sekretion von IFN- γ ist immunologisch von Bedeutung, da sie den Aktivierungsstatus der T-Zellen anzeigt und einen Hinweis darauf gibt, ob Immunität oder Toleranz ausgelöst wird.

4.11 Mit Annexin 1 kultivierte dendritische Zellen hemmen die Proliferation und IFN- γ -Produktion von T-Zellen

Um zu überprüfen, ob auch die Inkubation der dendritischen Zellen mit Annexin 1 zu einer veränderten T-Zell-Antwort führt, wurde ein analoges Experiment mit Annexin 1 durchgeführt. Ein Schema des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 4.11A dargestellt.

Abbildung 4.11B zeigt die TNF-Sekretion der verwendeten dendritischen Zellen. Bei Inkubation der dendritischen Zellen mit Annexin 1 ist die Sekretion von TNF vermindert. Die zwei Tage nach dem LPS-Stimulus zugegebenen CFSE-gefärbten OT-II-T-Zellen wurden drei weitere Tage später der Kokultur entnommen und ihre Proliferation im Durchflusszytometer untersucht. Die Sekretion von IFN- γ wurde im ELISA gemessen. Analog zu dem Experiment mit apoptotischen Zellen (Abb. 4.10) proliferierten die T-Zellen, die mit Annexin 1-behandelten dendritischen Zellen kokultiviert wurden, zu einem geringeren Prozentsatz (Abb. 4.11C) und sezernierten weniger IFN- γ als die Kontroll-T-Zellen (Abb. 4.11D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl apoptotische Zellen als auch rekombinantes Annexin 1 die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur T-Zell-Stimulation reduzieren. Die verringerte IFN- γ -Produktion könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich um eine Proliferation handelt, die nicht zu einer Immunantwort führt. Wie sich die T-Zellen in diesem Experiment verändern, ob sie mittelfristig sterben, anerg werden oder zu regulatorischen T-Zellen reprogrammiert werden, müssen weitere Experimente zeigen.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Annexin 1 bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals von apoptotischen Zellen zu dendritischen Zellen eine Rolle spielt und ob eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung von Annexin 1 auf dendritische Zellen zu einer veränderten T-Zell-Antwort führt. Die Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Apoptotische Zellen unterdrücken die LPS-induzierte TNF-Sekretion von U937-Zellen, während die Sekretion von IL-10 nicht beeinflusst ist. Die Suppression ist zellkontaktabhängig und wird durch gegen Annexin 1 gerichtete Antikörper weitgehend aufgehoben. Analog supprimieren apoptotische murine Milzzellen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion primärer muriner dendritischer Zellen. Die Sekretion von TNF, IL-12 (p70) und IL-1 β ist verringert; die Sekretion von IL-13 ist nicht beeinträchtigt.

Rekombinantes Annexin 1 unterdrückt die TNF-Sekretion von U937-Zellen, wenn es an eine Phosphatidylserin-Oberfläche gebunden ist. Murine dendritische Zellen werden sowohl von Annexin 1 auf Phosphatidylserin als auch von löslichem murinen und humanen Annexin 1 supprimiert. Die Suppression wird durch Antikörper gegen Annexin 1 aufgehoben. Eine Denaturierung des Annexin 1 verhindert eine Bindung an Phosphatidylserin, beeinflusst jedoch nicht die anti-inflammatorische Wirkung. Die Behandlung von primären murinen dendritischen Zellen mit rekombinantem Annexin 1 reduziert nicht nur die Cytokinsekretion, sondern auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40. Die Expression von MHC II-Molekülen ist nicht beeinflusst.

Mit Annexin 1 inkubierte, primäre murine dendritische Zellen weisen zudem eine reduzierte Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen auf. Die T-Zellen teilen sich in geringerem Ausmaß und sekretieren weniger IFN- γ .

5.1 Apoptotische Zellen hemmen die pro-inflammatorische Cytokinsekretion dendritischer Zellen

U937-Zellen entstammen einem histiocytischen Lymphom und können durch Zugabe von Mitogenen wie PMA zu adhären Zellen differenziert werden. Differenzierte U937-Zellen exprimieren viele Oberflächenmarker, die typisch sind für dendritische Zellen (Abb. 4.1A). Sie sezernieren nach LPS-Stimulation dosisabhängig TNF (Abb. 4.1B) und phagozytieren apoptotische Zellen (Abb. 4.1C). Daher stellen sie ein

zuverlässiges und dendritischen Zellen ähnliches Zellsystem dar, um die Auswirkung apoptotischer Zellen auf die Cytokinsekretion von Phagocyten zu untersuchen. Da sie nur begrenzt zur Stimulation von T-Zellen in der Lage sind, können sie experimentell nicht für alle Fragestellungen anstelle von primären dendritischen Zellen verwendet werden.

Sowohl apoptotische Neutrophile als auch apoptotische Jurkat-T-Zellen hemmen dosisabhängig die LPS-induzierte TNF-Sekretion von U937-Zellen (Abb. 4.2B und 4.2C). Die Sekretion von IL-10 ist nicht beeinflusst. Ebenso hemmen apoptotische murine Milzzellen die Sekretion von TNF, IL-1 β und IL-12 (p70) bei primären murinen dendritischen Zellen (Abb. 4.6). Die Sekretion von IL-13 ist nicht beeinflusst. Die selektive Suppression der pro-inflammatorischen Cytokine zeigt, dass es sich um einen spezifischen Effekt der apoptotischen Zellen auf bestimmte Signaltransduktionswege handelt und nicht um ein unspezifisches Abschalten der dendritischen Zelle. Die Suppression erfordert einen Zellkontakt zwischen U937-Zellen und apoptotischen Zellen (Abb. 4.2D). Die Zellkontaktabhängigkeit der Suppression weist darauf hin, dass ein auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen gebundenes Molekül und nicht ein löslicher Faktor die beobachteten Effekte vermittelt.

Die Beobachtungen zum suppressiven Effekt apoptotischer Zellen sind in Einklang mit einem Großteil der in diesem Gebiet veröffentlichten Literatur (Übersicht in Savill et al. 2002, Krysko et al. 2006). So hemmen apoptotische Zellen die Reifung dendritischer Zellen und reduzieren ihre Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation (Ferguson et al. 2002, Stuart et al. 2002). Hugues et al. (2002) können durch Induktion von Apoptose in den β -Zellen des Pankreas den Ausbruch von Diabetes in anfälligen Mäusen verhindern. Liu et al. (2002) injizieren mit Ovalbumin beladene apoptotische Milzzellen und beobachten eine Toleranzinduktion gegenüber Ovalbumin in Gegenwart von Freund'schem Adjuvans. In anderen Fällen werden immunstimulatorische Wirkungen apoptotischer Zellen beschrieben. Hierbei handelt es sich jedoch in der Regel um Untersuchungen, die darauf abzielen, mit Hilfe apoptotischer Tumorzellen Immunität gegen den Tumor zu erzeugen (Banchereau & Palucka 2005). In diesen Fällen werden dendritische Zellen *ex vivo* mit apoptotischen Tumorzellen kokultiviert. Zur Aktivierung der dendritischen Zellen werden hohe Konzentrationen an LPS oder anderer Stimuli verwendet, um eine maximale Reifung der dendritischen Zellen zu erreichen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass durch Annexin 1 vermittelte Suppression apoptotischer Zellen durch hohe Konzentrationen LPS aufgehoben werden kann (Abb. 4.7B). Da apoptotisches Material jedoch auch unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich von dendritischen Zellen in den

Lymphknoten transportiert wird (Huang et al. 2000) und dort Toleranz auslösen kann, besteht die Gefahr, dass das Immunsystem nicht gegen den Tumor aktiviert wird, sondern es zu einer Induktion von Toleranz gegen die Tumorantigene kommt (Zitvogel et al. 2004). Obeid et al. (2007) beschreiben die Induktion eines immunogenen Zelltods bei Tumorzellen durch Behandlung mit Anthrazyklinen. Die Immunogenität wird durch die frühe Exposition von Calreticulin auf den apoptotischen Zellen vermittelt. Auch wenn in diesem Fall die Exposition exogen durch Gabe von Anthrazyklinen ausgelöst wurde, lässt sich darüber spekulieren, ob die sterbenden Zellen unterschiedliche Moleküle besitzt, die die Immunogenität des Zelltods in die eine oder andere Richtung beeinflussen können. Während in einem Nicht-Gefahren-Kontext das Annexin 1-Signal überwiegen würde, könnte eine frühe Exposition von Calreticulin ein gegenteiliges Signal vermitteln. Durch die gezielte Manipulation dieser Mechanismen könnte die Gefahr einer ungewollten Toleranzinduktion gegen Tumorantigene bei der Tumorstimmung möglicherweise vermieden werden.

5.2 Die Hemmung der Cytokinsekretion wird durch Annexin 1 vermittelt

Als möglicher Kandidat für die Vermittlung des anti-inflammatorischen Effektes apoptotischer Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe das cytosolische Protein Annexin 1 identifiziert, das früh während der Apoptose an die Oberfläche der sterbenden Zellen transloziert (Abb. 4.3B). Tatsächlich wird die Hemmung der TNF-Sekretion von Phagozyten durch apoptotische Zellen sowohl im humanen als auch im murinen System durch die Zugabe gegen rekombinantes Annexin 1 gerichteter $F(ab')_2$ -Fragmente weitgehend aufgehoben (Abb. 4.3A und Abb. 4.6C). Dass polyklonale Antikörper gegen Annexin 1 den suppressiven Effekt apoptotischer Zellen aufheben, ist ein Befund, der die Verbindung zwischen den Experimenten mit apoptotischen Zellen und den Experimenten mit rekombinantem Annexin 1 herstellt. Das Ausmaß der Hemmung könnte erste Hinweise für die mögliche Bedeutung von Annexin 1 *in vivo* geben. Die gegen Annexin 1 gerichteten $F(ab')_2$ -Fragmente heben eine durch rekombinantes Annexin 1 hervorgerufene Hemmung vollständig auf (Abb. 4.8D). Die Aufhebung des Effektes apoptotischer Zellen durch die $F(ab')_2$ -Fragmente zeigt, dass in diesem System Annexin 1 offenbar der hauptsächliche Vermittler anti-inflammatorischer Signale zwischen apoptotischen Zellen und Phagozyten ist. Die Ergebnisse passen zu den Beobachtungen, dass Annexin 1-defiziente Mäuse eine verstärkte immunologische Reaktion auf experimentell induzierte Entzündungen aufweisen (Hannon et al. 2003).

Annexin 1 ist ein cytosolisches Protein, das in Gegenwart von Calcium an negativ geladene Phospholipide von Membranen bindet. Es wird von Glucocorticoiden transkriptional induziert und trägt zur Hemmung der Eicosanoidsynthese bei (Wallner et al. 1986). Glucocorticoide führen zudem in Neutrophilen zu einer Externalisation von Annexin 1 an die Zelloberfläche über einen ER/Golgi-unabhängigen Mechanismus (Castro-Caldas et al. 2002). Extrazelluläres Annexin 1 wurde vor allem mit einer verminderten Extravasation von Neutrophilen in Verbindung gebracht. Die Externalisation von Annexin 1 während der Apoptose wurde erstmals von Arur et al. (2003) beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe konnte bei humanen Neutrophilen und Jurkat-T-Zellen während der Apoptose ebenfalls eine frühe Externalisierung beobachtet werden (Abb. 4.3B und Weyd 2005). Die Translokation erfolgt, bevor die DNA gespalten wird und die Membranintegrität zusammenbricht (Weyd 2005). Diese Eigenschaft von Annexin 1 ist entscheidend für eine mögliche Rolle als anti-inflammatorisches Molekül. Ein tolerogenes Signal sollte auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen verfügbar sein, sobald die ersten „Eat-me“-Signale auf der Oberfläche erscheinen und die Aufnahme der sterbenden Zelle durch professionelle Phagozyten beginnt. Die Menge des in den Zellen vorhandenen sowie des externalisierten Annexin 1 ist zelltypspezifisch und liegt pro Million Zellen im einstelligen Mikrogramm-Bereich (Abb. 4.3C und Daten nicht gezeigt). Die auf der Oberfläche der Zellen beobachteten Mengen an Annexin 1 geben daher einen Anhaltspunkt, wie viele Moleküle für eine Interaktion mit anderen Zellen zur Verfügung stehen und in welchem Mengbereich die Zugabe von rekombinantem Annexin 1 zu dendritischen Zellen in *in vitro*-Experimenten noch als „physiologisch“ betrachtet werden kann.

Die Expression von Annexin 1 ist im humanen System intensiv untersucht worden (Morand et al 1995, Dreier et al. 1998). Das Protein ist in verschiedenen Geweben exprimiert, insbesondere in vielen Zellen des hämatopoetischen Systems, im Nervensystem und in Epithelien. Innerhalb des Immunsystems wird humanes Annexin 1 stark in Neutrophilen exprimiert, sowie in T-Zellen, Monocyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und NK-Zellen. B-Zellen und Erythrocyten enthalten dagegen kaum Annexin 1. Die großen Mengen an Annexin 1, die in Neutrophilen und CEM-T-Zellen mit Hilfe des ELISA bestimmt wurden (Abb. 4.3C und Daten nicht gezeigt), stimmen mit Angaben aus der Literatur überein, die sowohl für Neutrophile als auch für T-Zellen einen hohen Annexin 1-Gehalt beschreiben, der bis zu 4 % des Gesamtproteingehalts umfassen kann (Morand et al. 1995, Dreier et al. 1998, Perretti & Flower 2004). Mit Hilfe des gegen murines Annexin 1 gerichteten monoklonalen Antikörpers 8D10 konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die

Expression von Annexin 1 im Maussystem untersucht werden. Wie im humanen System ist Annexin in vielen immunologisch relevanten Geweben wie im Knochenmark, in der Milz, im Thymus und in den Lymphknoten exprimiert (Abb. 4.5C). In der Leber wird Annexin 1 hingegen nicht exprimiert (Abb. 4.5C). In dendritischen Zellen und den Makrophagen-Zelllinien J774 und Raw 264.7 ist das Protein ebenfalls vorhanden (Daten nicht gezeigt). Die geringe Expression im Thymus war zunächst unerwartet, da in unserer Arbeitsgruppe im menschlichen System die Expression von Annexin 1 auf einer Population apoptotischer Thymocyten gezeigt wurde (Weyd 2005). Die Analyse verschiedener muriner Thymom-Zelllinien zeigte jedoch eine Expression in einigen der immortalisierten Zellklone (Abb. 4.5D). Welchem Stadium der Thymocyten-Entwicklung die Thymome entsprechen, ist aufgrund einer Veränderung der Zellen in Kultur nicht zweifelsfrei zuzuordnen.

Es stellt sich die Frage, ob aus dem Expressionsmuster im humanen sowie im murinen System Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins gezogen werden können. Einige Zelltypen wie Neutrophile exprimieren Annexin 1 konstitutiv, in anderen kann die Expression unter bestimmten Bedingungen induziert werden. So geht die Aktivierung von T-Zellen mit einer erhöhten Annexin 1-Expression einher (Brenner 2002), Keratinocyten exprimieren im Zuge ihrer terminalen Differenzierung zunehmend Annexin 1 (Dreier et al. 1998, Guzman-Aranguez et al. 2005) und in Leberzellen wird die Expression von Annexin 1 nach Verletzungen induziert (de Coupade et al. 2000). Eine hohe Expression von Annexin 1 tritt also insbesondere in Zellen auf, die wie Neutrophile im physiologischen Gleichgewicht eine hohe Apoptoserate besitzen oder wie aktivierte T-Zellen und gestresste Leberzellen in eine Phase erhöhter Apoptose eintreten können. In Abwesenheit von Gefahrensignalen können die apoptotischen Zellen durch Annexin 1 auf der Oberfläche den Phagozyten ein anti-inflammatorisches Signal vermitteln und so zu ihrer immunologisch unauffälligen Entsorgung beitragen. Diese Hypothese vermag das Expressionsmuster von Annexin 1 jedoch nicht vollständig zu erklären, da B-Zellen trotz einer hohen Apoptoserate fast kein Annexin 1 enthalten. Das Bild wird noch komplexer, wenn man berücksichtigt, dass verschiedene Gewebe jeweils verschiedene Mitglieder der Annexin-Familie exprimieren, die in ihrer Funktion möglicherweise redundant sind. Gerke und Moss (2002) sprechen in diesem Zusammenhang von einem gewebespezifischen „Annexin-Fingerabdruck“. Untersuchungen an Mäusen mit einer genetischen Defizienz für Annexin 5, 6 und 7 lassen jedoch vermuten, dass nicht alle Annexine ein immunologisch relevantes Signal vermitteln (Brachvogel et al. 2003, Hawkins et al. 1999, Herr et al. 2001).

5.3 Annexin 1 hemmt die Reifung dendritischer Zellen

Die TNF-Sekretion der U937-Zellen wird durch Annexin 1 gehemmt, das auf eine Phosphatidylserin-Oberfläche gebunden wurde, jedoch nicht durch lösliches Annexin 1 (Abb. 4.4C). Die Präsentation des Annexin 1 auf einer Oberfläche entspricht möglicherweise eher einem physiologischeren Stimulus, da die Moleküle dieselbe Orientierung besitzen wie auf der Oberfläche einer apoptotischen Zelle und in ihrer flächigen Anordnung zur Kreuzvernetzung möglicher Rezeptoren führen könnten. Primäre murine dendritische Zellen werden hingegen sowohl von löslichem als auch von Phosphatidylserin-gebundenem Annexin 1 in ihrer Cytokinsekretion beeinflusst (Abb. 4.7B und 4.8.A). Möglicherweise reagieren sie sensitiver auf einen Annexin 1-Stimulus oder eine Kreuzvernetzung ist für das Signal nicht notwendig. In der Literatur finden sich ausschließlich Untersuchungen mit löslichem Annexin 1 (Gerke & Moss 2002). In diesen Experimenten werden jedoch die Freisetzung von L-Selectin oder die Migration von Neutrophilen gemessen und nicht die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Annexin 1 auf Phagocyten untersucht.

Während bei U937-Zellen die Sekretion von IL-10 nicht durch Zugabe von Annexin 1 beeinflusst wird (Abb. 4.4C), zeigen die mit Phosphatidylserin und Annexin 1 inkubierten murinen dendritischen Zellen ein IL-10-Sekretionsmuster, das dem des TNF gleicht (4.7B). Insgesamt wird jedoch nur wenig IL-10 sezerniert. Eine Reduktion der IL-10-Sekretion durch rekombinantes Annexin 1 konnte auch bei humanen dendritischen Zellen beobachtet werden (H. Weyd, persönliche Kommunikation). Möglicherweise handelt es sich bei der unveränderten IL-10-Sekretion daher um eine Besonderheit der U937-Zellen, die für die Aufklärung der Annexin 1-Signaltransduktion hilfreich sein könnte. Die Titration des LPS-Stimulus in Abb. 4.7B zeigt zudem, dass die durch Annexin 1 hervorgerufene Hemmung der Cytokinsekretion mit zunehmenden LPS-Konzentrationen abnimmt. Dieses Phänomen konnte auch bei den U937-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Offenbar werden die durch Annexin 1 und LPS hervorgerufenen Signale in der Zelle integriert. Ein ausreichend starkes pro-inflammatorisches Signal hebt das anti-inflammatorische Signal des Annexin 1 auf. Möglicherweise versetzt diese Signalintegration die Zelle in die Lage, in Situationen, in denen beide Stimuli vorhanden sind, situationsabhängig entweder ein pro- oder ein anti-inflammatorisches Signal an T-Zellen weiterzugeben.

Wird denaturiertes Annexin 1 zu einer Phosphatidylserin-Oberfläche gegeben, ist kein suppressiver Effekt auf die TNF-Sekretion muriner dendritischer Zellen nachweisbar (Abb. 4.7C). Wird das Protein direkt zu den Zellen gegeben, behält es jedoch seine

anti-inflammatorische Aktivität (Abb. 4.8B). Vermutlich tritt im ersten Fall durch die Denaturierung ein Verlust der Phosphatidylserin-Bindungsfähigkeit ein, so dass das Protein im Experiment bei Abnahme des Puffers vor Zugabe der Zellen gewaschen wird. Dies spricht dafür, dass das Protein tatsächlich denaturiert wurde und zumindest innerhalb von zwei Stunden Phosphatidylserin-Bindung nicht renaturierte. Dass das denaturierte Protein bei direkter Zugabe zu den Zellen seine suppressive Wirkung beibehält, deutet darauf hin, dass die aktive Domäne durch die Denaturierung nicht beeinträchtigt wurde und möglicherweise als lineares Peptid im Molekül enthalten ist. Als aktive Domänen von Annexin 1 wurden bei Untersuchungen der Neutrophilen-Extravasation der lineare N-Terminus und ein als Antiflammin bezeichnetes Nonapeptid im dritten Annexin-Repeat des Moleküls beschrieben (Yang et al. 1997, Moreno 1996, Zouki et al. 2001). Im Falle der Extravasation bindet Annexin 1 an den Formylpeptidrezeptor auf Neutrophilen (Walther et al. 2000). Bislang konnten jedoch in unserer Arbeitsgruppe keine Hinweise auf eine Beteiligung des FPR bei der Vermittlung des Annexin 1-Signals von apoptotischen Zellen an Phagozyten gefunden werden (A. Mahr, persönliche Kommunikation). Die Verwendung einer Annexin 1-Mutante mit deletiertem N-Terminus könnte Aufschluss darüber geben, ob der N-Terminus bei der Vermittlung von Signalen im hier untersuchten Kontext eine Rolle spielt.

Rekombinantes Annexin 1 supprimiert neben der TNF-Sekretion von dendritischen Zellen auch die TNF-Sekretion von Makrophagen (Abb. 4.7D). Da Makrophagen in noch stärkerem Maße als dendritische Zellen an der Aufnahme von apoptotischem Material beteiligt sind, ist zu erwarten, dass auch sie anti-inflammatorischen Signalen gegenüber empfänglich sind. Eine Suppression von Makrophagen ist möglicherweise für das Cytokinmilieu am Ort der Aufnahme von entscheidender Bedeutung (Savill et al. 2002). Die Autoren vermuten, dass das von supprimierten Makrophagen sezernierte TGF β zu einem anti-inflammatorischen Cytokinmilieu führt, das die tolerogene Aufnahme von apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen begünstigt.

Für die Interaktion der dendritischen Zellen mit T-Zellen spielt neben den sezernierten Cytokinen die Expression derjenigen Oberflächenmoleküle eine Rolle, die Signale an T-Zellen vermitteln. Die Behandlung der dendritischen Zellen mit rekombinantem Annexin 1 reduziert die Expression der kostimulatorischen Marker CD86 und CD40, beeinflusst jedoch die Expression von MHC II nicht (Abb. 4.9B). Annexin 1 beeinflusst also nicht nur die Cytokinsekretion der dendritischen Zellen und damit das Milieu am Ort der Phagozytose, sondern auch die Expression kostimulatorischer Moleküle und damit den Phänotyp der zum Lymphknoten wandernden dendritischen Zelle. Die Expression von MHC II-Molekülen war in einigen Experimenten ebenfalls reduziert, in

anderen jedoch erhöht und in den meisten Experimenten unverändert. Eine konstante Expression der MHC-Moleküle garantiert möglicherweise eine gleich bleibend effiziente Antigenpräsentation gegenüber den T-Zellen.

Für eine weitere Charakterisierung der dendritischen Zellen wäre es in Zukunft wichtig, weitere Moleküle der B7-Familie zu untersuchen. Insbesondere die Expression der Moleküle PDL-1, PDL-2, B7-H3 und B7-H4, für die im Gegensatz zu CD80 und CD86 eine inhibitorische Wirkung auf T-Zellen beschrieben ist (Greenwald et al. 2005), könnte Aufschluss über die folgende Interaktion der dendritischen Zellen mit T-Zellen geben. Weitere auf dendritischen Zellen vorhandene inhibitorische Rezeptoren sind die Moleküle ILT3 und ILT4, die Homologien zu Rezeptoren auf NK-Zellen aufweisen (Chang et al. 2002). Für *in vivo*-Studien wären außerdem Moleküle von Interesse, die Rückschlüsse über das Migrationsverhalten der dendritischen Zellen zulassen, wie beispielsweise der Lymphknoten-*Homing*-Rezeptor CCR7 (Sozzani et al. 1998).

Der Phänotyp der durch Annexin 1 erzeugten dendritischen Zellen ähnelt dem Phänotyp verschiedener in der Literatur beschriebener tolerogener dendritischer Zellen. So zeigen Huang et al. (2000) im Maussystem, dass dendritische Zellen, die kontinuierlich apoptotische Zellen aus dem Darm in den Lymphknoten befördern, eine starke Expression von MHC II-Molekülen aufweisen und auch kostimulatorische Moleküle besitzen. Verschiedene Autoren beschreiben die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch dendritische Zellen, die einen semi-reifen Phänotyp aufweisen. Menges et al. (2002) generieren toleranzinduzierende B7-positive dendritische Zellen *in vitro* durch Stimulation mit TNF. Wakkach et al. (2003) erzeugen ihre dendritischen Zellen durch Differenzierung in Gegenwart von IL-10. Diese dendritischen Zellen ähneln den durch Behandlung mit Annexin 1 erzeugten insofern, als sie eine reduzierte Expression von CD86, CD80 und MHC II zeigen und resistent gegenüber einer Stimulation mit LPS sind. McGuirk et al. (2002) induzieren Tr1-Zellen mit Hilfe von dendritischen Zellen, die mit einem toleranzinduzierenden Protein aus *Bordella pertussis* behandelt wurden. Auch sie finden einen Phänotyp der dendritischen Zellen, der durch die intermediäre Expression von CD86 und CD40 sowie in diesem Fall durch eine geringe Expression von MHC II gekennzeichnet ist. Auch im menschlichen System wird das Auslösen von Toleranz durch unreife, semi-reife sowie durch reife dendritische Zellen beschrieben (Jonuleit et al. 2000, Sauter et al. 2000, Verhasselt et al. 2004). Im letzten Fall ist die Expression von MHC II, CD86 und CD80 sogar notwendig für die Induktion FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen (Verhasselt et al. 2004). In einer Synopse der vorhandenen Literatur charakterisieren Lutz & Schuler (2002) tolerogene dendritische Zellen als semi-reif, einhergehend mit einer interme-

diären Expression kostimulatorischer Moleküle und einer fehlenden IL-12-Sekretion.

Aufgrund dieser Experimente ist das Modell, in dem unreife dendritische Zellen Toleranz erzeugen und reife dendritische Zellen Immunität, revisionsbedürftig geworden (Shortman & Heath 2001). Ein neues Modell geht davon aus, dass unreife dendritische Zellen gegenüber Antigenen ignorant sind, während reife dendritische Zellen Interaktionen mit T-Zellen eingehen können. Befindet sich die reife dendritische Zelle in einem ruhenden Zustand, erzeugt sie Toleranz, ist die dagegen aktiviert, folgt eine Immunantwort (Albert et al. 2001, Steinman et al. 2003). Reife dendritische Zellen unterscheiden sich in diesem Konzept von unreifen dendritischen Zellen durch eine verminderte Phagozytosekapazität, die Fähigkeit, zum Lymphknoten zu wandern und durch eine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle. Der für die Wanderung in den Lymphknoten erforderliche Grad der Reife kann auch spontan nach Phagozytose in der Peripherie erfolgen. Shortman & Liu (2002) gehen davon aus, dass der normale Lebensweg einer dendritischen Zelle die Wanderung aus dem Gewebe in den Lymphknoten beinhaltet. Erfolgt ein zusätzlicher inflammatorischer Stimulus, vor allem über CD40, gehen die ruhenden reifen dendritischen Zellen in einen aktivierten Zustand über. Dieses Konzept wurde in einem sehr eleganten Experiment von Probst et al. (2003) bestätigt. Über ein Cre-LoxP-System wurde in CD11c-positiven Zellen die Expression von CD8-Epitopen des Lymphocytischen Choriomeningitis-Virus (LCMV) induziert. Durch diese induzierbare Expression von Neoselbstantigenen werden die natürlicherweise vorhandenen, gegen LCMV gerichteten CD8-T-Zellen zu „neoautoreaktiven“ T-Zellen. Ohne den Transfer von Zellen können die Autoren so die Interaktion von ruhenden dendritischen Zellen mit den LCMV-spezifischen CD8-T-Zellen untersuchen. Als Vergleich dienen LCMV-Epitope exprimierende dendritische Zellen, die durch die Injektion von stimulierenden Antikörpern gegen CD40 aktiviert wurden. Die ruhenden dendritischen Zellen induzieren in diesem Experiment Toleranz, die auch durch nachfolgende Infektion mit LCMV nicht gebrochen werden kann, während die aktivierten dendritischen Zellen eine Immunantwort auslösen.

Die durch Annexin 1 und geringe Dosen LPS generierten dendritischen Zellen ähneln den semi-reifen dendritischen Zellen, die auf dem Weg zum Lymphknoten isoliert wurden (Shortman & Heath 2001) und in verschiedenen experimentellen Systemen regulatorische Tr1-Zellen induzieren. Die partielle Reifung durch geringe Konzentrationen LPS im *in vitro*-System könnte *in vivo* durch eine erhöhte spontane Reifung nach Phagozytose erfolgen, die unreife dendritische Zellen vor ihrer Wanderung zum Lymphknoten in Abwesenheit von Aktivierungssignalen durchlaufen (Shortman & Liu 2002). Zudem konnte in Abwesenheit von LPS eine leichte

Aktivierung der dendritischen Zellen durch apoptotische Zellen oder rekombinantes Annexin 1 beobachtet werden (Abb. 4.8 und Daten nicht gezeigt). Möglicherweise bewirkt Annexin 1 in Abwesenheit aktivierender Stimuli einen Impuls zur Wanderung in den Lymphknoten, während es im Falle einer unerwünschten Aktivierung der dendritischen Zelle nach der Aufnahme apoptotischen Materials gegensteuert. In diesem Fall würde die Annexin 1-Externalisierung bei apoptotischen Zellen eine Parallele zur beschriebenen Funktion von Annexin 1 bei der Extravasation von Neutrophilen aufweisen. In diesem System führt Annexin 1 aufgrund einer veränderten Adhäsion zu einem veränderten Migrationsverhalten von Neutrophilen (Getting et al. 1997). *In vivo*-Experimente mit den *in vitro* durch Annexin 1 generierten dendritischen Zellen werden zeigen, ob die dendritischen Zellen eine tolerogene Wirkung in einem physiologischen Umfeld besitzen.

5.4 Apoptotische Zellen und Annexin 1 hemmen die T-Zell-Stimulation muriner dendritischer Zellen

Primäre dendritische Zellen, die mit apoptotischen Zellen oder Annexin 1 inkubiert wurden, hemmen sowohl die antigenspezifische Proliferation von T-Zellen als auch ihre IFN- γ -Sekretion (Abb. 4.10 und 4.11).

Die reduzierte Proliferation und die reduzierte IFN- γ -Sekretion der T-Zellen zeigen, dass Annexin 1 in den dendritischen Zellen nicht nur kurzfristige Veränderungen hervorruft, sondern zu einem über mehrere Tage stabilen suppressiven Phänotyp der dendritischen Zellen führt. Da die dendritischen Zellen und die OT-II-T-Zellen aus Mäusen mit demselben genetischen Hintergrund stammen (C57BL/6), handelt es sich um eine ovalbumin- und damit antigenspezifische Aktivierung der T-Zellen. Vermutlich handelt es sich auch um eine antigenspezifische Suppression. In einer polyklonalen T-Zell-Population sollten alle Zellen toleriert werden, die auf in den apoptotischen Zellen vorhandenen Antigene reagieren, während alle anderen T-Zellen reaktiv für ihre jeweiligen Erreger bleiben sollten. Dies ist wichtig, um im Körper die Reaktivität des T-Zell-Repertoires gegenüber Pathogenen aufrecht zu erhalten. Unter diesen experimentellen Rahmenbedingungen ist dies jedoch schwer zu überprüfen.

Für das Zusammentreffen von potentiell autoreaktiven T-Zellen mit tolerogenen dendritischen Zellen sind drei verschiedene Szenarien in der Literatur beschrieben: Eliminierung, Anergisierung und Induktion von regulatorischen T-Zellen (Übersicht in Steinman et al. 2003). Die Eliminierung erfolgt durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD), der ebenfalls einen Toleranzmechanismus darstellt (Brenner et al. 2007). Für den Ausgang der Interaktion sind Unterschiede zwischen CD4-T-Zellen und CD8-T-

Zellen beobachtet worden (Shortman & Heath 2001).

Kommen CD4-T-Zellen mit tolerogenen dendritischen Zellen in Kontakt, führt dies im Maussystem entweder zu einer Anergie der Zellen (Adler et al. 1998, Lutz et al. 2000, Mahnke et al. 2001, Kawahat et al. 2002) oder zu der Entwicklung regulatorischer Zellen mit einem Tr1-Phänotyp (Akbari et al. 2001, Menges et al. 2002, McGuirk et al. 2002) oder einem Phänotyp natürlicher regulatorischer T-Zellen (Chen et al. 2003, Apostolou & von Boehmer 2004). Im menschlichen System beobachteten Jonuleit et al. (2000) die Induktion von Tr1-Zellen nach wiederholter Stimulation mit unreifen dendritischen Zellen. Verhasselt et al. (2004) beschreiben die Induktion natürlicher regulatorischer T-Zellen durch *in vitro* generierte und mit LPS gereifte dendritische Zellen. Ob es sich in Maus und Mensch in diesen Fällen um eine Expansion vorhandener regulatorischer T-Zellen oder ihrer Vorläufer handelt oder um eine Konversion konventioneller T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen, ist Gegenstand intensiver Debatte. Verhasselt et al. (2004) beobachteten eine Induktion CD25^{high} FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen in einer Population CD25-negativer Zellen, aus der die CD25^{high}-Zellen zuvor durch Sortieren im Durchflusszytometer entfernt wurden. Eine Kontamination durch regulatorische CD25-negative FoxP3-positive regulatorische Zellen ist jedoch auch in diesem Fall nicht ausgeschlossen.

Kommen CD8-T-Zellen mit tolerogenen dendritischen Zellen in Kontakt, führt dies in den meisten Fällen zu einer Proliferation, die mit einer Eliminierung der Zellen endet und zu dauerhafter Toleranz gegenüber den im tolerogenen Kontext präsentierten Antigenen führt (murin: Kurts et al. 1997, Hawiger et al. 2001, Liu et al. 2002, Bonifaz et al. 2002, human: Albert et al. 2001, Dhodapkar et al. 2002). Faunce et al. (2004) beobachteten einen regulatorischen Phänotyp muriner dendritischer Zellen nach Differenzierung der dendritischen Zellen mit TGFβ. Dhodapkar und Steinman (2002) beschreiben im Menschen die Induktion regulatorischer CD8-T-Zellen durch die Injektion von unreifen dendritischen Zellen, die mit Proteinen des Influenza-Virus beladen wurden.

Die Aktivierung von CD8-T-Zellen ist im Vergleich zu CD4-T-Zellen durch einen zusätzlichen Mechanismus gesichert (Albert et al. 2001). Treffen CD8-T-Zellen in Abwesenheit von CD4-T-Zellen auf dendritische Zellen, folgt eine Tolerisierung der CD8-T-Zellen. Für die Auslösung einer immunogenen Aktivierung der CD8-T-Zellen ist ein CD40L-Signal der CD4-Helfer-T-Zellen an die dendritischen Zellen notwendig. Dieser Mechanismus garantiert, dass die hocheffizienten cytotoxischen Effektorzellen nur dann aktiviert werden, wenn die drohende Gefahr auch von anderen Teilen des Immunsystems erkannt wurde.

Mehrere Modelle haben gezeigt, dass dendritische Zellen, die durch die Phagozytose apoptotischer Zellen einen regulatorischen Phänotyp erlangt haben, in der Lage sind, Toleranz hervorzurufen (Sauter et al. 2000, Liu et al. 2002, Albert et al. 2001). Um die Interaktion zwischen dendritischen Zellen, die ein Annexin 1-Signal erhalten haben, und OT-II-transgenen T-Zellen besser zu charakterisieren, sollte daher der Phänotyp der entstehenden T-Zellen besser untersucht werden. Anergie Zellen sind nach dem Zusammentreffen funktionell inaktiviert. Sie reagieren nicht mehr auf aktivierende Stimuli, zirkulieren jedoch noch eine begrenzte Zeit (Schwartz 2003). Tr1-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Sekretion von IL-10 aus und supprimieren die Proliferation konventioneller T-Zellen *in vitro* (Jonuleit et al. 2002). Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen können ebenfalls in der Peripherie induziert werden (von Boehmer 2005, Dhodapkar & Steinman 2002). Sie unterscheiden sich von konventionellen T-Zellen durch eine erhöhte Expression von CD25, CTLA-4 und die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Übersicht in Sakaguchi 2004). Sie supprimieren in *in vitro*-Assays ebenfalls die Proliferation konventioneller T-Zellen. Neben den Oberflächenmarkern sollte auch das Cytokinprofil der T-Zellen nach Kontakt mit Annexin 1-behandelten dendritischen Zellen weiter untersucht werden. Aufschluss über die Funktion der T-Zellen geben neben IFN- γ vor allem die mit Aktivierung assoziierten Cytokine IL-2 und IL-4 sowie die als regulatorisch beschriebenen Cytokine IL-10 und TGF β .

5.5 Modell zur Rolle von Annexin 1 in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Annexin 1 auf apoptotischen Zellen ein anti-inflammatorisches Signal an dendritische Zellen vermittelt, das zu einer geringeren Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine und einer reduzierten Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle führt. Die dendritischen Zellen zeigen einen Phänotyp, der dem tolerogener dendritischer Zellen ähnelt. T-Zellen, die mit diesen dendritischen Zellen in Kontakt kommen, proliferieren in geringerem Ausmaß und sekretieren weniger IFN- γ als T-Zellen, die von nicht mit Annexin 1 behandelten dendritischen Zellen aktiviert wurden. Annexin 1 hat somit sowohl einen Einfluss auf die lokale Entwicklung des Cytokinmilieus, als auch auf die nachfolgende Aktivierung von T-Zellen.

Die Daten zeigen, dass Annexin 1 auf apoptotischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Signals an dendritische Zellen spielt.

Das Annexin 1-Signal verhindert eine Aktivierung der mit Autoantigenen aus apoptotischen Zellen beladenen dendritischen Zellen und damit eine Proliferation potentiell autoreaktiver T-Zellen. Dies stellt einen Mechanismus dar, körpereigene Antigene als ungefährlich einzustufen, und trägt so möglicherweise zur Eliminierung oder Reprogrammierung potentiell autoreaktiver T-Zellen bei.

Abb. 5.1 zeigt in einem Modell, wie Annexin 1 auf apoptotischen Zellen zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beitragen könnte. Im Thymus durchlaufen T-Zellen kontinuierlich die verschiedenen Prozesse der zentralen Toleranz (oben links). Positiv selektionierte T-Zellen werden in die Peripherie entlassen. Die meisten dieser Zellen sind nicht autoreaktiv, einige können jedoch potentiell durch Selbstanti-

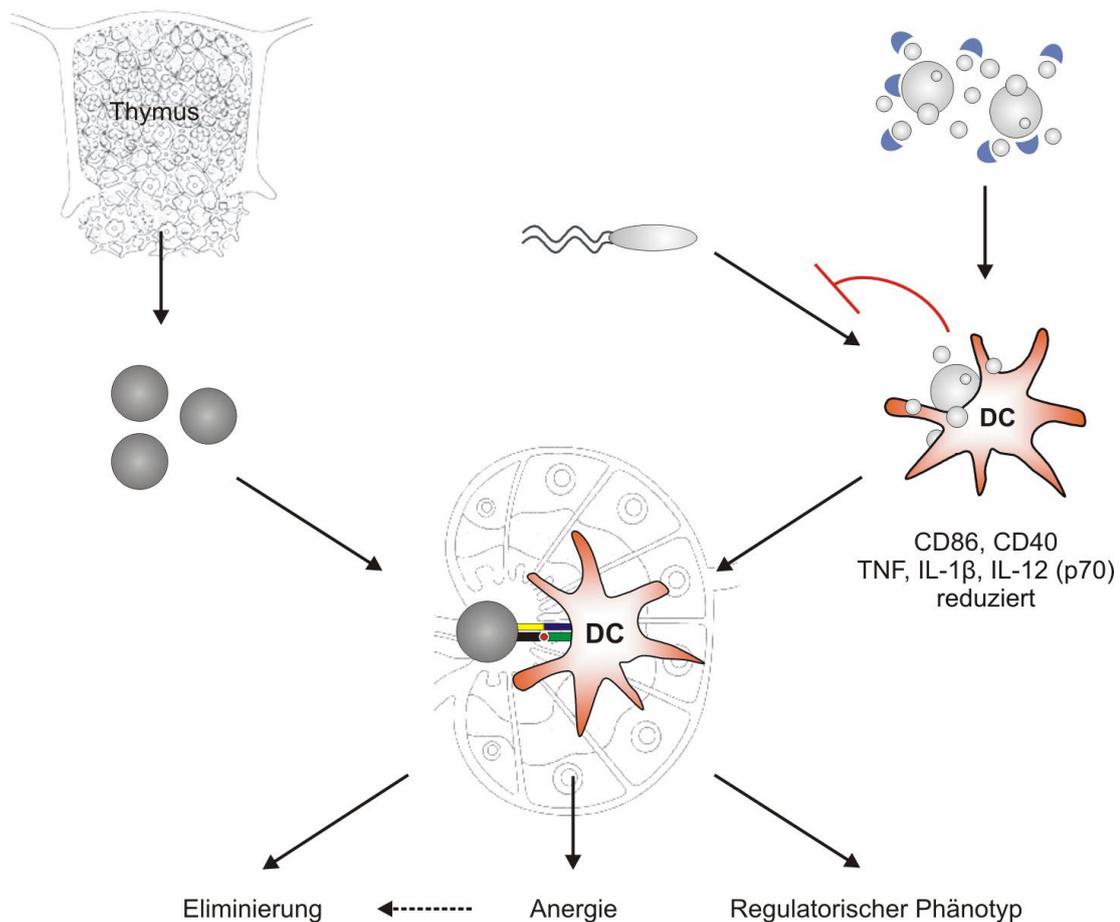


Abbildung 5.1: Modell zur Rolle von Annexin 1 in der peripheren Toleranz

Im Thymus durchlaufen kontinuierlich T-Zellen die verschiedenen Prozesse der zentralen Toleranz (oben links). Einige der in die Peripherie entlassenen Zellen können potentiell durch Selbstantigene aktiviert werden (schwarze Zellen). Ebenfalls kontinuierlich sterben Zellen in den verschiedenen Geweben des Körpers, um die Homöostase der Zellen aufrecht zu erhalten (oben rechts). Annexin 1 auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen führt zu einem tolerogenen Phänotyp der dendritischen Zellen. Die Zellen reagieren nur noch schwach auf LPS. Die dendritischen Zellen wandern in den Lymphknoten und präsentieren die in den apoptotischen Zellen vorhandenen Selbstantigene zirkulierenden T-Zellen (Mitte). Treffen die tolerogenen dendritischen Zellen auf potentiell autoreaktive T-Zellen, die mit ihrem T-Zell-Rezeptor ein von den dendritischen Zellen präsentiertes Selbstantigen aus den apoptotischen Zellen erkennen, führt

dies zu einem Ausschalten der autoreaktiven Aktivität der T-Zelle durch Eliminierung, Anergie oder Induktion eines regulatorischen Phänotyps (unten).

gene aktiviert werden (schwarze Zellen). Die T-Zellen migrieren durch Blut- und Lymphsystem, bis sie auf ihr Antigen treffen. Ebenfalls kontinuierlich sterben Zellen in den verschiedenen Geweben des Körpers, um die Homöostase der Zellen aufrecht zu erhalten (oben rechts). Während der Apoptose externalisieren die Zellen Annexin 1, das von den Phagozyten, die für eine schnelle Aufnahme der apoptotischen Zellen sorgen, als Signal erkannt wird. Das durch Annexin 1 vermittelte Signal führt zu einem tolerogenen Phänotyp der dendritischen Zellen, der mit einer reduzierten Reaktion auf potentielle Gefahrensignale wie LPS einhergeht. Die dendritischen Zellen prozessieren die in den apoptotischen Zellen vorhandenen Selbstantigene und präsentieren sie in MHC I- und MHC II-Molekülen. Sie wandern in den Lymphknoten, wo sie auf zirkulierenden T-Zellen treffen (Mitte). Treffen die tolerogenen dendritischen Zellen auf potentiell autoreaktive T-Zellen, die mit ihrem T-Zell-Rezeptor ein von den dendritischen Zellen präsentiertes Selbstantigen aus den apoptotischen Zellen erkennen, führt dies zu einer Tolerisierung der T-Zelle. In der Literatur sind verschiedene Szenarien für diese Situation beschrieben (Kurts et al. 1997, Adler et al. 1998, Verhasselt et al. 2004). Möglicherweise wird in der autoreaktiven T-Zelle Apoptose ausgelöst und die Zelle auf diesem Weg eliminiert (unten links) oder die Zelle wird in einen anergen Zustand versetzt und mittelfristig aus der Population entfernt (unten Mitte). Die immunologisch eleganteste Lösung wäre die Konversion zu einer regulatorischen T-Zelle (unten rechts). In diesem Fall würde nicht nur die autoreaktive Aktivität dieser speziellen T-Zelle ausgeschaltet, sondern es könnte in Zukunft auch eine Aktivierung weiterer potentiell autoreaktiver T-Zellen verhindert werden. Diese „Kreuztolerisierung“ betreffe alle weiteren potentiell autoreaktiven T-Zellen, deren Antigene in dem apoptotischen Material vorhanden sind und daher zusammen mit dem Antigen der konvertierten Zelle präsentiert werden. Ob das Annexin 1-Signal bevorzugt zu einem dieser Wege führt, werden weitere Untersuchungen im Maussystem *ex vivo* und *in vivo* zeigen.

5.6 Ausblick

Immunologische Prozesse sind stets ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Immunzellen zu verschiedenen Zeitpunkten in unterschiedlichen Geweben eines Organismus. Um die physiologische Rolle von Annexin 1 zu verstehen, ist es daher wünschenswert, neben den *in vitro*- und *ex vivo*-Experimenten auch *in vivo* Erkenntnisse über die Aufnahme apoptotischer Zellen und die Auswirkung dieses Prozesses auf die Immunantwort zu untersuchen.

Im Maussystem ist Annexin 1 *in vivo* bereits mit verschiedenen anti-inflammatorischen Phänomenen in Zusammenhang gebracht worden. Annexin 1-defiziente Mäuse weisen eine verstärkte immunologische Reaktion auf experimentelle Entzündungen auf (Hannon et al. 2003). In anderen Modellen konnten experimentell erzeugte Entzündungsreaktionen durch Injektion von Annexin 1 oder Peptiden des Proteins gemildert werden (Yang et al. 1997, Cirino et al. 1993). Wurde Annexin 1 durch Antikörper inhibiert, bildeten sich verstärkt zymosaninduzierte Ödeme (Perretti et al. 1996). Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf dendritische Zellen und nachfolgend auf T-Zellen zu diesen in der Literatur beschriebenen Reaktionen *in vivo* beitragen.

Um die Rolle von Annexin 1 bei der Toleranzinduktion durch apoptotische Zellen zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau konzipiert, in dem die durch Annexin 1 induzierte Modulation dendritischer Zellen und deren Auswirkung auf die nachfolgende T-Zell-Antwort gemessen werden kann. In diesem System werden durch Annexin 1 modulierte, mit Ovalbumin beladene dendritische Zellen in Mäuse injiziert, die zuvor eine Injektion ovalbuminspezifischer OT-II-T-Zellen erhalten haben. Das Versuchsschema ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

Beim Menschen gestaltet sich die Untersuchung der *in vivo*-Rolle von Annexin 1 bei der Aufnahme apoptotischer Zellen schwierig, jedoch bieten natürlich auftretende Störungen des Systems die Möglichkeit, auch beim Menschen Rückschlüsse über die ablaufenden Prozesse zu ziehen. Eine Störung der Aufnahme apoptotischer Zellen ist für die menschliche Autoimmunkrankheit des Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) beschrieben (Herrmann et al. 1998).

Um zu untersuchen, wodurch bei SLE-Patienten eine mangelnde immunologische Toleranz gegenüber apoptotischen Antigenen hervorgerufen wird, wurde in einem Kooperationsprojekt eine Studie mit bisher 20 SLE-Patienten und gesunden Spendern durchgeführt. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, dass tatsächlich eine Störung der Toleranzinduktion auf Seiten der apoptotischen Zelle eine Rolle spielen könnte. Eine Beurteilung der Daten ist auf Grund der noch nicht ausreichenden Anzahl der Experimente und der hohen Variation zwischen den Zellen der Patienten aber auch zwischen den Zellen der normalen gesunden Spender nicht einfach. Die Untersuchung weiterer Patienten wird zeigen, ob bei einer Untergruppe von SLE-Patienten eine Störung der Toleranzinduktion durch apoptotische Zellen vorliegt und ob Annexin 1 in diesem Prozess eine Rolle spielt.

Die Untersuchung der Rolle von Annexin 1 in einem transgenen Maussystem und einer humanen Autoimmunerkrankung können dazu beitragen, die Mechanismen der

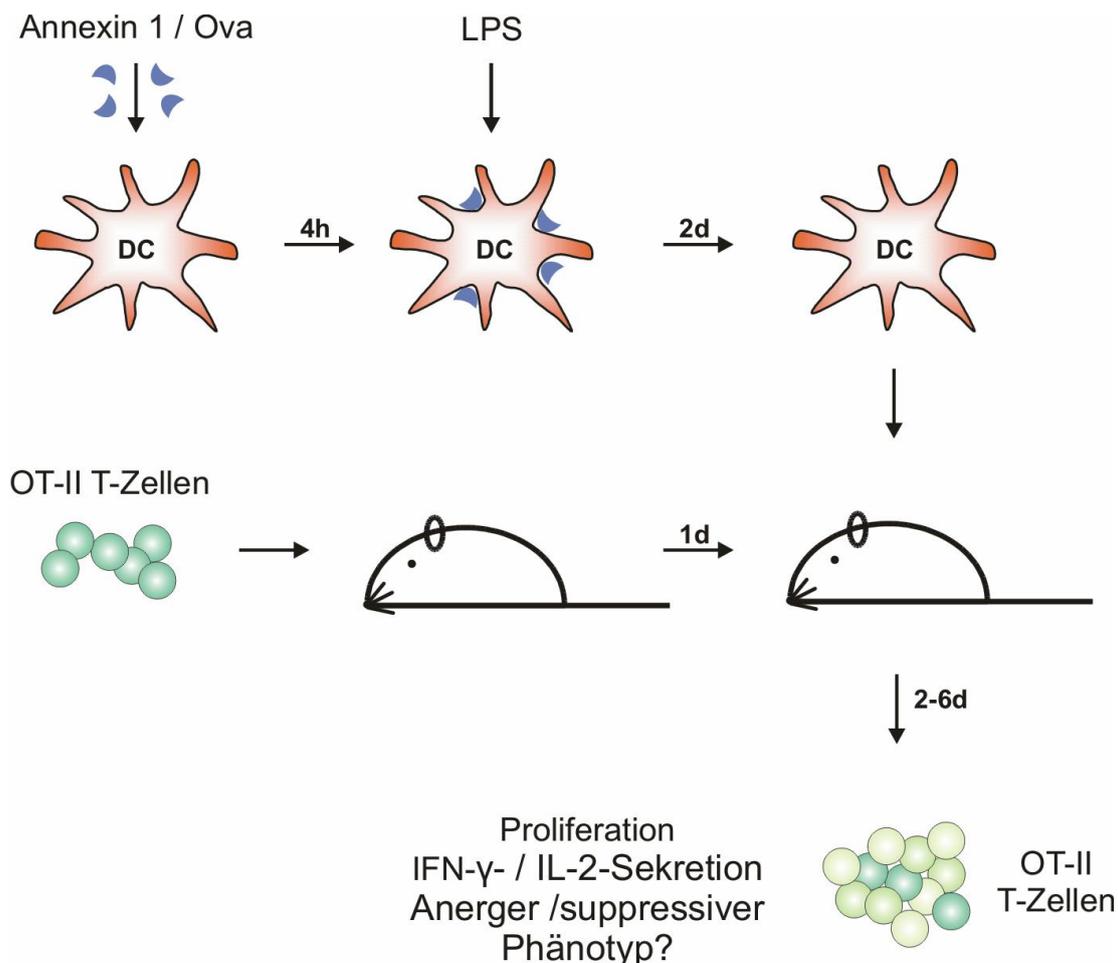


Abbildung 5.2: Ablaufschema der geplanten *in vivo*-Versuche

Primäre murine dendritische Zellen werden mit Annexin1 und Ovalbumin inkubiert. 4 h später werden die dendritischen Zellen mit LPS stimuliert. Zwei Tage nach der Stimulation werden die dendritischen Zellen in eine C57BL/6-Maus injiziert, die einen Tag zuvor eine Injektion mit CFSE-gefärbten syngeneten OT-II-transgenen T-Zellen (OT-II-TC) erhalten hat. In den lymphoiden Geweben der Maus sollte nun eine Interaktion zwischen den injizierten dendritischen Zellen und den mittlerweile zirkulierenden OT-II-T-Zellen stattfinden. Nach 2-6 Tagen werden die OT-II-T-Zellen aus den lymphoiden Geweben reisoliert und ihr Phänotyp untersucht.

peripheren immunologischen Toleranz *in vivo* zu verstehen. Dieses Verständnis könnte den Anstoß zur Entwicklung spezifischer Therapieansätze geben, um beispielsweise bei SLE-Patienten die Gabe von systemischen Immunsuppressiva zu ersetzen. Zudem ermöglicht das Wissen um die Mechanismen der peripheren Toleranz unter Umständen eine Manipulation der Toleranzinduktion. Neue Therapien könnten darauf abzielen, Toleranz gegen bestimmte Antigene auszulösen und so Autoimmunität zu verhindern oder Immunität gegen Tumorantigene gezielt auszulösen und so eine Abstoßung des Tumors zu bewirken.

6 Literaturverzeichnis

- Adler, A.J., Marsh, D.W., Yochum, G.S., Guzzo, J.L., Nigam, A., Nelson, W.G., and Pardoll, D.M. (1998). CD4+ T Cell Tolerance to Parenchymal Self-Antigens Requires Presentation by Bone Marrow-derived Antigen-presenting Cells. *J Exp Med* 187, 1555-1564.
- Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2, 725-731.
- Albert, M.L., Jegathesan, M., and Darnell, R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2, 1010-1017.
- Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via alpha v beta 5 and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.
- Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Anderson, H.A., Maylock, C.A., Williams, J.A., Paweletz, C.P., Shu, H., and Shacter, E. (2003). Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 4, 87-91.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., *et al.* (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395-1401.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J Exp Med* 199, 1401-1408.
- Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C., and Krammer, Peter H. (2006). How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36, 1654-1658.
- Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., and Han, D.K. (2003). Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment. *Developmental Cell* 4, 587-598.
- Azuma, Y., Inami, Y., and Matsumoto, K. (2002). Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages. *Biol Pharm Bull* 25, 1277-1281.
- Bach, J. (2003). Regulatory T cells under scrutiny. *Nature Reviews Immunology* 3, 189-198.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.
- Balasubramanian, K., and Schroit, A.J. (1998). Characterization of Phosphatidylserine-dependent beta 2-Glycoprotein I Macrophage Interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *J Biol Chem* 273, 29272-29277.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Ann Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology* 5, 296-306.
- Bastian, B., Sellert, C., Seekamp, A., Römisch, J., Pâques, E., and Bröcker, E. (1993). Inhibition of human skin phospholipase A2 by "lipocortins" is an indirect effect of substrate/lipocortin interaction. *J Invest Dermatol* 101, 359-363.
- Beaver, J.P., and Stoneman, C.L. (1999). Exposure of N-acetylglucosamine decreases early in dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes, demonstrated by flow cytometry using wheat germ agglutinin and pokeweed mitogen. *Immunol Cell Biol* 77, 224-235.
- Benz, J., and Hofmann, A. (1997). Annexins: from structure to function. *Biol Chem* 378, 177-183.
- Binder, R.J., Han, D.K., and Srivastava, P.K. (2000). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 1, 151-155.
- Bishop, G., and Hostager, B. (2001). Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunol Res* 24, 97-109.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2004). Regulation of Phagosome Maturation by Signals from Toll-Like Receptors. *Science* 304, 1014-1018.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808-812.
- Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 3, 253-257.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7, 1092-1100.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Borisenko, G., Iverson, S., Ahlberg, S., Kagan, V., and Fadeel, B. (2004). Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. *Cell Death Differ* 11, 943-945.
- Bose, J., Gruber, A., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Kontgen, F., and Lengeling, A. (2004). The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* 3, 15.
- Böttcher, A., Gaip, U.S., Füllrohr, B.G., Herrmann, M., Girkontaite, I., Kalden, J.R., and Voll, R.E. (2006). Involvement of phosphatidylserine, alpha v beta 3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis Rheum* 54, 927-938.

- Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). 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, 829-840.
- Brachvogel, B., Dikschas, J., Moch, H., Welzel, H., von der Mark, K., Hofmann, C., and Poschl, E. (2003). Annexin A5 Is Not Essential for Skeletal Development. *Mol Cell Biol* 23, 2907-2913.
- Brenner, D. (2002). Mikroarray-Analyse differentiell regulierter Gene in aktivierten primären T-Zellen. Diplomarbeit
- Brenner, D., Krammer, P.H., and Arnold, R. (2007). Concepts of Activated T Cell Death. *Critical Reviews in Haematology and Oncology*, *in press*
- Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D.V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, M., Haegeman, G., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2004). Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. *Mol Biol Cell* 15, 1089-1100.
- Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C.D., and Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200-203.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.
- Bruno Della Gaspera, F.B.-B.M.B.F.C.C.G.-G.J.F.J.W.S.W. (2001). Annexin expressions are temporally and spatially regulated during rat hepatocyte differentiation. *Dev Dyn* 222, 206-217.
- Byrne, A., and Reen, D.J. (2002). Lipopolysaccharide Induces Rapid Production of IL-10 by Monocytes in the Presence of Apoptotic Neutrophils. *J Immunol* 168, 1968-1977.
- Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., *et al.* (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202, 1691-1701.
- Casciola-Rosen, L., Andrade, F., Ulanet, D., Wong, W.B., and Rosen, A. (1999). Cleavage by Granzyme B Is Strongly Predictive of Autoantigen Status: Implications for Initiation of Autoimmunity. *J Exp Med* 190, 815-826.
- Casciola-Rosen, L., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179, 1317-1330.
- Castro-Caldas, M., Duarte, C.B., Carvalho, A.P., and Fernandes Lopes, M.C. (2002). Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry* 237, 31-38.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and J. B. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.
- Chang, C.C., Ciubotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., *et al.* (2002). Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243.
- Chang, M.-K., Bergmark, C., Laurila, A., Horkko, S., Han, K.-H., Friedman, P., Dennis, E.A., and Witztum, J.L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: Evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *PNAS* 96, 6353-6358.
- Chen, J., Carey, K., and Godowski, P. (1997). Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 14, 2033-2039.
- Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF- β Released by Apoptotic T Cells Contributes to an Immunosuppressive Milieu. *Immunity* 14, 715-725.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-j., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Cikala, M., Alexandrova, O., David, C., Proschel, M., Stiening, B., Cramer, P., and Bottger, A. (2004). The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol* 5, 26.
- Cirino, G., Cicala, C., Sorrentino, L., Ciliberto, G., Arpaia, G., Perretti, M., and Flower, R. (1993). Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 108, 573-574.
- Ciurana, C.L.F., Zwart, B., van Mierlo, G., and Hack, C.E. (2004). Complement activation by necrotic cells in normal plasma environment compares to that by late apoptotic cells and involves predominantly IgM. *Eur J Immunol* 34, 2609-2619.
- Cocco, R.E., and Ucker, D.S. (2001). Distinct Modes of Macrophage Recognition for Apoptotic and Necrotic Cells Are Not Specified Exclusively by Phosphatidylserine Exposure. *J Immunol* 12, 919-930.
- Cohen, P.L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T.D., Jennette, J.C., Roubey, R.A.S., Earp, H.S., Matsushima, G., and Reap, E.A. (2002). Delayed Apoptotic Cell Clearance and Lupus-like Autoimmunity in Mice Lacking the c-mer Membrane Tyrosine Kinase. *J Exp Med* 196, 135-140.
- Corthay, A. (2006). A Three-cell Model for Activation of Naïve T Helper Cells. *Scand J Immunol* 64, 93-96.
- Cui, P., Qin, B., Liu, N., Pan, G., and Pei, D. (2004). Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Experimental Cell Research* 293, 154-163.
- Cvetanovic, M., and Ucker, D.S. (2004). Innate Immune Discrimination of Apoptotic Cells: Repression of Proinflammatory Macrophage Transcription Is Coupled Directly to Specific Recognition. *J Immunol* 172, 880-889.
- Dalgaard, J., Beckstrom, K.J., Jahnsen, F.L., and Brinchmann, J.E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Leukocyte Biol* 77, 689-698.
- de Coupade, C., and Solito, R.G.M.B.P.B.F.R.-M.E. (2000). Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin iii sv40 t large antigen transgenic mice. *Hepatology* 31, 371-380.

- Debret, R., El Btaouri, H., Duca, L., Rahman, I., Radke, S., Haye, B., Sallenave, J.M., and Antonicelli, F. (2003). Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Letters* *546*, 195-202.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science* *307*, 1630-1634.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* *2*, 1032-1039.
- Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L., and Gregory, C.D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* *392*, 505-509.
- Dhodapkar, M.V., and Steinman, R.M. (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8+ regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* *100*, 174-177.
- Dreier, R., Schmid, K.W., Gerke, V., and Riehemann, K. (1998). Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochemistry and Cell Biology* *110*, 137-148.
- Duffield, J.S., Ware, C.F., Ryffel, B., and Savill, J. (2001). Suppression by Apoptotic Cells Defines Tumor Necrosis Factor-Mediated Induction of Glomerular Mesangial Cell Apoptosis by Activated Macrophages, pp. 1397-1404.
- Eda, S., Yamanaka, M., and Beppu, M. (2004). Carbohydrate-mediated Phagocytic Recognition of Early Apoptotic Cells Undergoing Transient Capping of CD43 Glycoprotein. *J Biol Chem* *279*, 5967-5974.
- Edmunds, C., Parry, R., Burgess, S., Reaves, B., and Ward, S. (1999). CD28 stimulates tyrosine phosphorylation, cellular redistribution and catalytic activity of the inositol lipid 5-phosphatase SHIP. *Eur J Immunol* *29*, 3507-3515.
- Erdősová, B., Hlávková, L., Procházková, J., and Lichnovský, V. (2002). Part of CD68+ macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* *146*, 41-45.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* *101*, 890-898.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A.B., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85-90.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* *148*, 2207-2216.
- Fairhurst, A., Wandstrat, A.E., Wakeland, E.K., and Frederick, W.A. (2006). Systemic Lupus Erythematosus: Multiple Immunological Phenotypes in a Complex Genetic Disease. In *Advances in Immunology* (Academic Press), pp. 1-69.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 1206-1212.
- Faunce, D.E., Terajewicz, A., and Stein-Streilein, J. (2004). Cutting Edge: In Vitro-Generated Tolerogenic APC Induce CD8+ T Regulatory Cells That Can Suppress Ongoing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* *172*, 1991-1995.
- Ferguson, T.A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T.S., Schoenberger, S., and Green, D.R. (2002). Uptake of Apoptotic Antigen-Coupled Cells by Lymphoid Dendritic Cells and Cross-Priming of CD8+ T Cells Produce Active Immune Unresponsiveness. *J Immunol* *168*, 5589-5595.
- Ferlazzo, V., D'Agostino, P., Milano, S., Caruso, R., Feo, S., Cillari, E., and Parente, L. (2003). Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *International Immunopharmacology* *3*, 1363-1369.
- Fischer, U., Jänicke, R., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* *10*, 76-100.
- Franc, N. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci* *7*, d1298-1313.
- Frey, F. (2007). Herstellung und Bestimmung der Binungsstellen monoklonaler Antikörper gegen humanes Annexin1. Bachelorarbeit an der Fachhochschule Mannheim.
- Gao, Y., Herndon, J.M., Zhang, H., Griffith, T.S., and Ferguson, T.A. (1998). Antiinflammatory Effects of CD95 Ligand (FasL)-induced Apoptosis. *J Exp Med* *188*, 887-896.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.-A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* *123*, 321-334.
- Gavins, F.N.E., Yona, S., Kamal, A.M., Flower, R.J., and Perretti, M. (2003). Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood* *101*, 4140-4147.
- Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. (2005). ANNEXINS: LINKING Ca2+ SIGNALLING TO MEMBRANE DYNAMICS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *6*, 449-461.
- Gerke, V., and Moss, S.E. (2002). Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev* *82*, 331-371.
- Getting, S.J., Flower, R.J., and Perretti, M. (1997). Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol* *120*, 1075-1082.
- Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2002). Generation of Human CD8 T Regulatory Cells by CD40 Ligand-activated Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Exp Med* *195*, 695-704.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A.M., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.-K., Labigne, A., Zathringer, U., et al. (2003). Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* *300*, 1584-1587.
- Goodnow, C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T., Smith-Gill, S., Brink, R., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J., Loblay, R., K, R., et al. (1988). Altered

- immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-682.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3, 23-35.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Ann Rev Immunol* 23, 515-548.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 20, 621-667.
- Guzmán-Aránguez, A., and Lizarbe, N.O.J.T.E.L.P.P.-R.I.L.d.S.M.A. (2005). Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 94, 178-193.
- Haigler, H.T., Schlaepfer, D.D., and Burgess, W.H. (1987). Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33- kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 262, 6921-6930.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2004). Autoimmune Disease and Impaired Uptake of Apoptotic Cells in MFG-E8-Deficient Mice. *Science* 304, 1147-1150.
- Hanley, P.J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S.H., Dalpe, A.H., Sus, R., Heeg, K.M., Preisig-Muller, R., and Daut, J. (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *PNAS* 101, 9479-9484.
- Hannon, R., Croxtall, J.D., Getting, S.J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M.J., Gavins, F.N.E., Perretti, M., Morris, J.F., Buckingham, J.C., *et al.* (2002). Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in Annexin 1-/- Mouse. *FASEB J*, 02-0239fje.
- Hart, S.P., Alexander, K.M., MacCall, S.M., and Dransfield, I. (2005). C-reactive protein does not opsonize early apoptotic human neutrophils, but binds only membrane-permeable late apoptotic cells and has no effect on their phagocytosis by macrophages. *J Inflammation* 2.
- Hart, S.P., Ross, J.A., Ross, K., Haslett, C., and Dransfield, I. (2000). Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: Implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ*.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. *J Exp Med* 194, 769-780.
- Hawkins, T.E., Roes, J., Rees, D., Monkhouse, J., and Moss, S.E. (1999). Immunological Development and Cardiovascular Function Are Normal in Annexin VI Null Mutant Mice. *Mol Cell Biol* 19, 8028-8032.
- Henneke, P., and Golenbock, D.T. (2004). Phagocytosis, Innate Immunity, and Host-Pathogen Specificity. *J Exp Med* 199, 1-4.
- Herr, C., Smyth, N., Ullrich, S., Yun, F., Sasse, P., Hescheler, J., Fleischmann, B., Lasek, K., Brixius, K., Schwinger, R.H.G., *et al.* (2001). Loss of Annexin A7 Leads to Alterations in Frequency-Induced Shortening of Isolated Murine Cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 21, 4119-4128.
- Herrmann, M., Voll, R., Zoller, O., Hagenhofer, M., Ponner, B., and Kalden, J. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 41, 1241-1250.
- Hirt, U.A., and Leist, M. (2003). Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ* 10, 1156-1164.
- Huang, F.-P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., and MacPherson, G.G. (2000). A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes. *J Exp Med* 191, 435-444.
- Hugues, S., Mougneau, E., Ferlin, W., Jeske, D., Hofman, P., Homann, D., Beaudoin, L., Schriker, C., Von Herrath, M., Lehuen, A., *et al.* (2002). Tolerance to Islet Antigens and Prevention from Diabetes Induced by Limited Apoptosis of Pancreatic [beta] Cells. *Immunity* 16, 169-181.
- Huynh, M.-L.N., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 109, 41-50.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., e Sousa, C.R., Germain, R.N., Mellman, I., and Steinman, R.M. (2000). The Formation of Immunogenic Major Histocompatibility Complex Class II-Peptide Ligands in Lysosomal Compartments of Dendritic Cells Is Regulated by Inflammatory Stimuli. *J Exp Med* 191, 927-936.
- Ip, W.-K., and Lau, Y.-L. (2004). Distinct Maturation of, but Not Migration between, Human Monocyte-Derived Dendritic Cells upon Ingestion of Apoptotic Cells of Early or Late Phases. *J Immunol* 173, 189-196.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.
- Janeway, C. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, 1-13.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). Infectious Tolerance: Human CD25+ Regulatory T Cells Convey Suppressor Activity to Conventional CD4+ T Helper Cells. *J Exp Med* 196, 255-260.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of Interleukin 10-producing, Nonproliferating CD4+ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.
- Kagan, V.E., Gleiss, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Elenstrom-Magnusson, C., Liu, S.-X., Serinkan, F.B., Arroyo, A., Chandra, J., Orrenius, S., *et al.* (2002). A Role for Oxidative Stress in Apoptosis: Oxidation and Externalization of Phosphatidylserine Is Required for Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas-Mediated Apoptosis. *J Immunol* 169, 487-499.
- Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa,

- S., Setoguchi, K., Miyazaki, J.-i., and Yamamoto, K. (2002). Generation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Autoreactive T Cells Simultaneously with Their Negative Selection in the Thymus and from Nonautoreactive T Cells by Endogenous TCR Expression. *J Immunol* 168, 4399-4405.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Seminars in Immunology* 19, 24-32.
- Kerr, J., Wyllie, A., and Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, S., Elkon, K.B., and Ma, X. (2004). Transcriptional Suppression of Interleukin-12 Gene Expression following Phagocytosis of Apoptotic Cells. *Immunity* 21, 643-653.
- Kim, S.J., Gershov, D., Ma, X., Brot, N., and Elkon, K.B. (2003). Opsonization of Apoptotic Cells and Its Effect on Macrophage and T Cell Immune Responses. *Ann N Y Acad Sci* 987, 68-78.
- Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., et al. (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13, 423-431.
- Kreinin, P., Urquidí, V., Lubman, D., and Goodison, S. (2004). Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics* 4, 2754-2765.
- Krysko, D., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2006). Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11, 1709-1726.
- Kunisaki, Y., Masuko, S., Noda, M., Inayoshi, A., Sanui, T., Harada, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y. (2004). Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylinositol receptor. *Blood* 103, 3362-3364.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1997). Class I-restricted Cross-Presentation of Exogenous Self-Antigens Leads to Deletion of Autoreactive CD8+ T Cells. *J Exp Med* 186, 239-245.
- Kurts, C., Sutherland, R.M., Davey, G., Li, M., Lew, A.M., Blanas, E., Carbone, F.R., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *PNAS* 96, 12703-12707.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Ann Rev Immunol* 24, 571-606.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langen, R., Isas, J.M., Hubbell, W.L., and Haigler, H.T. (1998). A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *PNAS* 95, 14060-14065.
- Lasker, M.V., and Nair, S.K. (2006). Intracellular TLR Signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *J Immunol* 177, 11-16.
- Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of Apoptotic Cells: Getting Rid of the Corpses. *Molecular Cell* 14, 277-287.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S.M., Xiao, Y.-j., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. (2003). Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* 113, 717-730.
- Lee, J.-W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A.-r., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 8, 181-190.
- Li, M., Davey, G.M., Sutherland, R.M., Kurts, C., Lew, A.M., Hirst, C., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2001). Cell-Associated Ovalbumin Is Cross-Presented Much More Efficiently than Soluble Ovalbumin In Vivo. *J Immunol* 166, 6099-6103.
- Li, M.O., Sarkisian, M.R., Mehal, W.Z., Rakic, P., and Flavell, R.A. (2003). Phosphatidylinositol Receptor Is Required for Clearance of Apoptotic Cells. *Science* 302, 1560-1563.
- Liemann, S., and Lewit-Bentley, A. (1995). Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3, 233-237.
- Ling, Q., Jacovina, A.T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R.L., Hempstead, B., Mark, W.H., and Hajjar, K.A. (2004). Annexin II regulates fibrin homeostasis and neovascularization in vivo. *J Clin Invest* 113, 38-48.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2002). Immune Tolerance After Delivery of Dying Cells to Dendritic Cells In Situ. *J Exp Med* 196, 1091-1097.
- Liu, L., Fisher, A., and Zimmerman, U. (1995). Regulation of annexin I by proteolysis in rat alveolar epithelial type II cells. *Biochem Mol Biol Int* 36, 373-381.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A.H., and Abbas, A.K. (2003). The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 4, 664-669.
- Lorimore, S., Coates, P., Scobie, G., Milne, G., and Wright, E. (2001). Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? . *Oncogene* 20, 7085-7095.
- Lutz, M., Suri, Rakesh M., Niimi, M., Ogilvie, A.L.J., Kukutsch, Nicole A., Röβner, S., Schuler, G., and Austyn, Jonathan M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 30, 1813-1822.
- Lutz, M.B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology* 23, 445-449.
- Macian, F., Im, S.-H., Garcia-Cozar, F.J., and Rao, A. (2004). T-cell anergy. *Current Opinion in Immunology* 16, 209-216.
- Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J., and Enk, A.H. (2003). Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101, 4862-4869.
- Martin, S., Reutelingsperger, C., McGahon, A., Rader, J., van Schie, R., LaFace, D., and Green, D. (1995). Early redistribution of plasma membrane

- phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Masaki, T., Tokuda, M., Fujimura, T., Ohnishi, M., Tai, Y., Miyamoto, K., Itano, T., Matsui, H., Watanabe, S., Sogawa, K., *et al.* (1994). Involvement of annexin I and annexin II in hepatocyte proliferation: can annexins I and II be markers for proliferative hepatocytes? *Hepatology* 20, 425-435.
- McGuirk, P., McCann, C., and Mills, K.H.G. (2002). Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195, 221-231.
- McHugh, R.S., and Shevach, E.M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110, 693-702.
- Menges, M., Roner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2001). Repetitive Injections of Dendritic Cells Matured with Tumor Necrosis Factor α Induce Antigen-specific Protection of Mice from Autoimmunity. *J Exp Med* 195, 15-22.
- Mevorach, D., Mascarenhas, J.O., Gershov, D., and Elkon, K.B. (1998). Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *J Exp Med* 188, 2313-2320.
- Miele, L. (2000). Antiflammins: Bioactive Peptides Derived from Uteroglobin. *Ann N Y Acad Sci* 923, 128-140.
- Mitchell, D.A., Pickering, M.C., Warren, J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Cook, H.T., Botto, M., and Walport, M.J. (2002). C1q Deficiency and Autoimmunity: The Effects of Genetic Background on Disease Expression. *J Immunol* 168, 2538-2543.
- Mitchell, J.E., Cvetanovic, M., Tibrewal, N., Patel, V., Colamonici, O.R., Li, M.O., Flavell, R.A., Levine, J.S., Birge, R.B., and Ucker, D.S. (2006). The Presumptive Phosphatidylserine Receptor Is Dispensable for Innate Anti-inflammatory Recognition and Clearance of Apoptotic Cells. *J Biol Chem* 281, 5718-5725.
- Moffatt, O.D., Devitt, A., Bell, E.D., Simmons, D.L., and Gregory, C.D. (1999). Macrophage Recognition of ICAM-3 on Apoptotic Leukocytes. *J Immunol* 162, 6800-6810.
- Morand, E.F., Hutchinson, P., Hargreaves, A., Goulding, N.J., Boyce, N.W., and Holdsworth, S.R. (1995). Detection of Intracellular Lipocortin 1 in Human Leukocyte Subsets. *Clinical Immunology and Immunopathology* 76, 195-202.
- Moreno, J. (2006). Effects of antiflammins on transglutaminase and phospholipase A2 activation by transglutaminase. *Int Immunopharmacol* 6, 300-303.
- Morgan, R., and Fernández, M. (1997). Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci* 53, 508-515.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukocyte Biol* 73, 209-212.
- Nakamura, K., Yuh, K., Sugyo, S., Kuroki, M., Shijo, H., and Tamura, K. (1999). Unresponsiveness of Peripheral T Cells Induced by Apoptotic Bodies Derived from Autologous T Cells. *Cellular Immunology* 193, 147-154.
- Nauta, A., Raaschou-Jensen, N., Roos, A., Daha, Mohamed R., Madsen, Hans O., Borrias-Essers, Maria C., Ryder, Lars P., Koch, C., and Garred, P. (2003). Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* 33, 2853-2863.
- Nauta, A., Trouw, L.A., Daha, Mohamed R., Tijsma, O., Nieuwland, R., Schwaebble, Wilhelm J., Gingras, Alexandre R., Mantovani, A., Hack, Erik C., and Roos, A. (2002). Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* 32, 1726-1736.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54-61.
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J Exp Med* 194, 781-796.
- Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-317.
- Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K.-i., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., and Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *PNAS* 95, 9535-9540.
- Okada, H., and Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 4, 592-603.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor Rejection by in Vivo Administration of Anti-CD25 (Interleukin-2 Receptor α) Monoclonal Antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.
- Oudinet, J., Russo-Marie, F., Cavadore, J., and Rothhut, B. (1993). Protein kinase C-dependent phosphorylation of annexins I and II in mesangial cells. *Biochem J* 292, 63-68.
- Palmer, E. (2003). Negative selection - clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* 3, 383-391.
- Parnaik, R., Raff, M.C., and Scholes, J. (2000). Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Current Biology* 10, 857-860.
- Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J., Harris, H., Wheller, S., and Flower, R. (1996). Acute inflammatory response in the mouse: exacerbation by immunoneutralization of lipocortin 1. *Br J Pharmacol* 117, 1145-1154.
- Perretti, M., and Flower, R.J. (2004). Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J Leukocyte Biol* 76, 25-29.
- Perretti, M., and Gavins, F.N.E. (2003). Annexin 1: An Endogenous Anti-Inflammatory Protein. *News Physiol Sci* 18, 60-64.

- Perretti, M., Getting, S.J., Solito, E., Murphy, P.M., and Gao, J.-L. (2001). Involvement of the Receptor for Formylated Peptides in the in Vivo Anti-Migratory Actions of Annexin 1 and its Mimetics. *Am J Pathol* 158, 1969-1973.
- Peter, M., and Krammer, P. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Petry, F. (1998). Molecular basis of hereditary C1q deficiency. *Immunobiology* 199, 286-294.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C.-L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., et al. (2003). Pyogenic Bacterial Infections in Humans with IRAK-4 Deficiency. *Science* 299, 2076-2079.
- Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., and Gordon, S. (1996). Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *PNAS* 93, 12456-12460.
- Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G., and van den Broek, M. (2003). Inducible Transgenic Mice Reveal Resting Dendritic Cells as Potent Inducers of CD8+ T Cell Tolerance. *Immunity* 18, 713-720.
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., and Noelle, R.J. (2004). CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. *Ann Rev Immunol* 22, 307-328.
- Rand, J.H. (2000). Antiphospholipid Antibody-mediated Disruption of the Annexin-V Antithrombotic Shield: a Thrombogenic Mechanism for the Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Autoimmunity* 15, 107-111.
- Raynal, P., Hullin, F., Ragab-Thomas, J., Fauvel, J., and Chap, H. (1993). Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase C. In vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. *Biochem J* 292, 759-765.
- Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Seminars in Immunology* 16, 27-34.
- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181, 1857-1862.
- Ren, Y., Stuart, L., Lindberg, F.P., Rosenkranz, A.R., Chen, Y., Mayadas, T.N., and Savill, J. (2001). Nonphagocytic Clearance of Late Apoptotic Neutrophils by Macrophages: Efficient Phagocytosis Independent of beta2 Integrins. *J Immunol* 166, 4743-4750.
- Restifo, N.P. (2000). Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology* 12, 597-603.
- Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.
- Riess, D. (2006). Untersuchungen zur Externalisierung von Annexin I während der Apoptose. In Division of Immunogenetics, DKFZ (Heidelberg, Universität Heidelberg), pp. 135.
- Roitt, Brostoff, and Male (2001). *Immunology*, 6th edition edn (London, Mosby Int. Ltd.).
- Roncarolo, M.-G., Levings, M.K., and Traversari, C. (2001). Differentiation of T Regulatory Cells by Immature Dendritic Cells. *J Exp Med* 193, 5F-10.
- Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 6, 6-12.
- Rosengarth, A., Gerke, V., and Luecke, H. (2001). X-ray Structure of Full-length Annexin 1 and Implications for Membrane Aggregation. *Journal of Molecular Biology* 306, 489-498.
- Roviezzo, F., Getting, S., Paul-Clark, M., Yona, S., Gavins, F., Perretti, M., Hannon, R., Croxtall, J., Buckingham, J., and Flower, R. (2002). The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol* 53, 541-553.
- Rutella, S., Danese, S., and Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses, pp. 531-562.
- Sakaguchi, S., Hori, S., Fukui, Y., Sasazuki, T., Sakaguchi, N., and Takahashi, T. (2003). Thymic generation and selection of CD25+CD4+ regulatory T cells: implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunological self-tolerance. *Novartis Found Symp* 252, 6-16.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J Exp Med* 191, 423-434.
- Savill, J. (1998). Apoptosis: Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392, 442-443.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2, 965-975.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131-136.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90, 1513-1522.
- Savill, J.S., Henson, P.M., and Haslett, C. (1989). Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 84, 1518-1527.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Schulz, O., and Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107, 183-189.
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G., and Gerke, V. (1996). The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an

- intact N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 7, 1359-1374.
- Sen, P., Wallet, M.A., Yi, Z., Huang, Y., Henderson, M., Mathews, C.E., Earp, H.S., Matsushima, G., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R.M. (2007). Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF- κ B activation in dendritic cells. *Blood* 109, 653-660.
- Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of Tumor Immunity by Removing CD25+CD4+ T Cells: A Common Basis Between Tumor Immunity and Autoimmunity. *J Immunol* 163, 5211-5218.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2, 3-12.
- Shortman, K., and Heath, W.R. (2001). Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 988-989.
- Skouteris, G.G., and Schroder, C.H. (1996). The Hepatocyte Growth Factor Receptor Kinase-mediated Phosphorylation of Lipocortin-1 Transduces the Proliferating Signal of the Hepatocyte Growth Factor. *J Biol Chem* 271, 27266-27273.
- Solito, E., Nuti, S., and Parente, L. (1994). Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *Br J Pharmacol* 112, 347-348.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., et al. (2003). Dendritic Cell Function in Vivo during the Steady State: A Role in Peripheral Tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987, 15-25.
- Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Inaugural Article: Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* 99, 351-358.
- Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J Exp Med* 191, 411-416.
- Stephan R. Scheffer, H.N.F.K.K.S.R.P.E.M.J.M.P.M.T. F.G. (2003). Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response <I>in vivo</I>. *Int J Cancer* 103, 205-211.
- Stuart, L.M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory Effects of Apoptotic Cell Ingestion upon Endotoxin-Driven Myeloid Dendritic Cell Maturation. *J Immunol* 168, 1627-1635.
- Stuart, L.M., Takahashi, K., Shi, L., Savill, J., and Ezekowitz, R.A.B. (2005). Mannose-Binding Lectin-Deficient Mice Display Defective Apoptotic Cell Clearance but No Autoimmune Phenotype. *J Immunol* 174, 3220-3226.
- Suankratay, Mold, Zhang, Potempa, Lint, and Gewurz (1998). Complement regulation in innate immunity and the acute-phase response: inhibition of mannan-binding lectin-initiated complement cytolysis by C-reactive protein (CRP). *Clinical & Experimental Immunology* 113, 353-359.
- Swairjo, M., and Seaton, B. (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 193-213.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. (2000). Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Staphylococcus aureus Infection. *J Immunol* 165, 5392-5396.
- Takizawa, F., Tsuji, S., and Nagasawa, S. (1996). Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Letters* 397, 269-272.
- Tang, X., Halleck, M., Schlegel, R., and Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272, 1495-1497.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (2000). Suppressor Effector Function of CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *J Immunol* 164, 183-190.
- Vandivier, R.W., Ogden, C.A., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Brown, K.K., Botto, M., Walport, M.J., Fisher, J.H., Henson, P.M., and Greene, K.E. (2002). Role of Surfactant Proteins A, D, and C1q in the Clearance of Apoptotic Cells In Vivo and In Vitro: Calreticulin and CD91 as a Common Collectin Receptor Complex. *J Immunol* 169, 3978-3986.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of Apoptotic Cells by Autologous iC3b Facilitates Clearance by Immature Dendritic Cells, Down-regulates DR and CD86, and Up-regulates CC Chemokine Receptor 7. *J Exp Med* 196, 1553-1561.
- Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P., and Goldman, M. (2004). Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4 pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 762-772.
- Verhoven, B., Schlegel, R., and Williamson, P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182, 1597-1601.
- Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A.B., Chisari, F.V., Buerki, K., and Pircher, H. (2000). Break of T Cell Ignorance to a Viral Antigen in the Liver Induces Hepatitis. *J Immunol* 165, 2415-2422.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricians) (Soluthurn, Jent & Gassmann).
- Voll, R., Roth, E., Girkontaite, I., Fehr, H., Herrmann, M., Lorenz, H., and JR, K. (1997). Histone-specific Th0 and Th1 clones derived from systemic lupus erythematosus patients induce double-stranded DNA antibody production. *Arthritis Rheum* 40, 2162-2171.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J.-P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Wallner, B.P., Mattaliano, R.J., Hession, C., Cate, R.L., Tizard, R., Sinclair, L.K., Foeller, C., Chow, E.P., Browning, J.L., Ramachandran, K.L., et al. (1986). Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* 320, 77-81.
- Walther, A., Riehemann, K., and Gerke, V. (2000). A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor: Annexin I Regulates Neutrophil Extravasation by Interacting with the FPR. *Molecular Cell* 5, 831-840.
- Wang, Y., Serfass, L., Roy, M.-O., Wong, J., Bonneau, A.-M., and Georges, E. (2004). Annexin-I expression

- modulates drug resistance in tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 565-570.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* 301, 1374-1377.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl4-4. *Science* 270, 985-988.
- Weyd, H. (2005). Die Rolle von Annexin I auf der Oberfläche humaner apoptotischer Zellen. Doktorarbeit an der Universität Hamburg.
- Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R., and Devaux, P. (1992). Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31, 6355-6360.
- Wing, K., Suri-Payer, E., and Rudin, A. (2005). CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells from Mouse to Man. *Scand J Immunol* 62, 1-15.
- Wyllie, A., Kerr, J., and Currie, A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Yang, Y., Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S., and Morand, E. (1997a). Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation* 21, 583-596.
- Yang, Y., Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S., and Morand, E. (1997b). Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation* 21, 583-596.
- Yuan H. Yang, E.F.M.S.J.G.M.P.-C.D.L.L.S.Y.R.H.J. C.B.M.P.R.J.F. (2004). Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 976-984.
- Zheng, L., He, M., Long, M., Blomgran, R., and Stendahl, O. (2004). Pathogen-Induced Apoptotic Neutrophils Express Heat Shock Proteins and Elicit Activation of Human Macrophages. *J Immunol* 173, 6319-6326.
- Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M.O., Chaput, N., Albert, M.L., Kroemer, G., and Frederick, W.A. (2004). Immune Response Against Dying Tumor Cells. In *Advances in Immunology* (Academic Press), pp. 131-179.
- Zouki, C., Ouellet, S., and Filep, J.G. (2000). The anti-inflammatory peptides, antinflammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. *FASEB J* 14, 572-580.

7 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	Funktionaler B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidester
cTEC	Epithelzelle des Thymuscortexes
DC	Dendritische Zelle
EAE	Experimentell induzierte allergische Encephalitis
ELISA	Enzymgekoppelter Immunosorbent-Assay
Fc	Rezeptorbindendes Fragment
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPR	Formylpeptidrezeptor
GST	Gluthationsulfonyltransferase
HAT	Aminopterin-haltiges Medium
HGRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSA	Humanes Serumalbumin
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon γ
IL-10	Interleukin-10
IRAK	Interleukin-assoziierte Rezeptorkinase
I κ B	Inaktiver NF κ B-Inhibitor
LAL	Limulus-Amöbocyten-Lysat

LPS	Lipopolysaccharid
Lta	Lipoteichonsäure
MHC	Major histocompatibility complex
mTEC	Thymische Epithelzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotidbindende Oligomerisationsdomäne
Ova	Ovalbumin
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster
PEG	Polyethylenglycol
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PS	Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
T _{con}	Konventionelle T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle

8 Veröffentlichungen

Spierings E, Vermeulen CJ, Vogt, MH, Doerner LEE, Falkenburg JHF, Mutis T and Goulmy E (2003). Identification of HLA class II-restricted H-Y-specific T-helper epitope evoking CD4+ T-helper cells in H-Y-mismatched transplantation. *Lancet* **362**, 610-15

Schlaman HR, Olsthoorn MM, Harteveld M, Dörner L, Djordjevic MA, Thomas-Oates JE, Spaink HP (2006). The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is stringently regulated by nodD and involves the nodRL genes. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**, 215-26.

9 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, im Juli 2007