

**Die Rolle von Annexin I**  
**auf der Oberfläche humaner apoptotischer Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften

im Department Biologie an der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Dipl. Biochem. Heiko Weyd**

**2006**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg wurde in der Zeit von November 2000 bis September 2005 unter der Leitung von Prof. P.H. Krammer in der Abteilung Immungenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. P. H. Krammer  
Abteilung Immungenetik  
DKFZ Heidelberg

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. L. Renwranz  
Zoologisches Institut  
Universität Hamburg

# Danksagung

Liebe Leser,

fünf Jahre Doktorarbeit, fünf Jahre als Nordlicht in Heidelberg. Viel ist passiert, und für vieles bin ich sehr dankbar:

Zunächst Danke an meine Eltern, für die Freiheit, für die Sicherheit und für alle Hilfe in den ganzen 33 Jahren – Worte sind hier naturgemäß viel zu wenig.

Danke auch an alle, bei denen ich (auf)richtige Wissenschaft gelernt habe. Wissenschaft, wie sie meiner Meinung nach sein sollte – ehrlich, diskursiv und offen für Kritik. Das ist die Devise des Krammer-Labors, und hoffentlich bleibt es so! Danke deshalb vor allem an Peter H. Krammer (auch für die Nachhilfestunden in Wissenschaftsgeschichte), an Andreas Krüger, Henning Walczak, Martin Sprick, Marc Bleumink und Lars Weingarten. Ein besonderes Dankeschön in diesem Sinne und für alle Gespräche an Elisabeth Letellier!

Einen riesen Dankeschön auch an alle Mitstreiter in der Annexin-Gruppe - an Lucie Dörner, Andrea Mahr, Dagmar Riess und Isabel Vogler - ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Es war ein langer Weg – nicht ohne LPSteine und TNF $\alpha$ gründe – aber wir haben gemeinsam viel erreicht und werden sicherlich noch so manche Annexi-Nuss zusammen knacken! Für alle Hilfe bei den Experimenten und für Geduld mit meinen manchmal unleserlichen Notizen danke ich Sandra Pfrang, Katrin Kappes, Marlene Pach und allen Azubis!

Für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Martina Schnölzer und Dr. Christine Falk bedanken. Herzlichen Dank auch an die Doctores Henning Schulze-Bergkamen, Claus-Detlev Klemke und Benedikt Fritzsching für die Abnahme vieler Liter kostbaren Blutes, ohne das diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

Last not least: Danke an alle im Labor für die gute Atmosphäre – was wäre die Arbeit ohne das Grillen auf der Neckarwiese, ohne eine grandiose Weihnachtsfeier und ohne das ein oder andere Feierabend-Bier (ohne Hintergedanken möchte ich an dieser Stelle auch Cornelius und Christian erwähnen, ohne deren technische Expertise wohl so manche Date im Computer-Nirwana verschwunden wäre).

Für eine gutes Arbeiten ist aber auch ein schönes zu Hause wichtig. Bei Wissenschaftlern scheint hierfür insbesondere Toleranz und viel Verständnis notwendig zu sein, da die Fehlerbalken der angegebenen Zeiten des „Nach-Hause-Kommens“ häufig mehrere Stunden betragen. Danke dafür an Carmen!

...und jetzt viel Spaß beim Lesen!

# Zusammenfassung

Apoptose ist der physiologische Zelltod zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und zur Beseitigung überzähliger und potentiell gefährlicher Zellen. Im Organismus werden apoptotische Zellen in der Regel schnell von Makrophagen oder dendritischen Zellen aufgenommen, so dass die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile der sterbenden Zellen verhindert wird. Spezifische Signale auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen vermitteln einerseits die schnelle Aufnahme der Zellen, andererseits wird zusätzlich die Auslösung einer Immunantwort gegen Autoantigene unterdrückt.

Durch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen apoptotische Jurkat T-Zellen konnte in dieser Arbeit das Protein Annexin I als neues, spezifisches Signal auf der Oberfläche humaner apoptotischer Zellen identifiziert werden. Die Analyse der Exposition von Annexin I ergab, daß das zytosolische Protein zu einem frühen Zeitpunkt im Verlauf der Apoptose durch einen energieabhängigen Transport auf die Zelloberfläche transportiert wird, wo es an negativ geladene Lipide bindet.

Um den Einfluss von Annexin I auf die Immunantwort zu untersuchen, wurden apoptotische Zellen in Kokultur-Experimenten mit primären humanen dendritischen Zellen eingesetzt. In diesem System führte die Phagozytose apoptotischer Zellen zu einer deutlichen Inhibition der LPS-induzierten Reifung von dendritischen Zellen. Unter dem Einfluß apoptotischer Zellen zeigten die dendritischen Zellen eine geringere Expression T-Zell-stimulatorischer Oberflächenmoleküle (CD86 und MHC Klasse II Moleküle) und sekretierten deutlich weniger pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ ). Die Sekretion von inhibitorischen Zytokinen (IL-10) wurde hingegen nicht beeinflusst. Überdies waren die inhibierten dendritischen Zellen nicht mehr in der Lage, naive T-Zellen effektiv zu stimulieren, sondern induzierten in den T-Zellen eine antigenspezifische Toleranz.

Mit Hilfe blockierender anti-Annexin I Antikörper und durch Zugabe von rekombinantem Annexin I konnte dieser inhibitorische Effekt zu einem großen Teil auf die Exposition von Annexin I auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen zurückgeführt werden. Diesen Ergebnissen zufolge stellt die Exposition von Annexin I auf apoptotischen Zellen ein anti-inflammatorisches Signal dar, das Immunreaktionen gegen Autoantigene inhibieren kann und auf diese Weise zur Induktion peripherer Toleranz beiträgt.

## Abstract

Apoptosis represents the most common form of cell death in the body. During development and in mature organisms, removal of excess cells by apoptosis ensures tissue homeostasis. To preclude the release of noxious cellular contents and the development of autoimmunity, dying cells are rapidly cleared by neighbouring phagocytes, e.g. macrophages or dendritic cells. Specific signals on the surface of apoptotic cells mediate efficient engulfment as well as suppression of immune responses against self antigens.

In this work, the generation of monoclonal antibodies directed against apoptotic Jurkat T cells led to the identification of the protein Annexin I as a new and specific signal on the surface of human apoptotic cells. A detailed analysis of the Annexin I-exposure showed an energy-dependent externalisation of the cytosolic protein during the early phase of apoptosis.

In order to investigate the influence of Annexin I on apoptotic cells towards the immune response, a coculture system of apoptotic cells and primary human dendritic cells (DC) was established. In this system, phagocytosis of apoptotic cells led to a substantial inhibition of LPS-induced DC-maturation. Inhibited DCs showed a reduced expression of costimulatory surface molecules (CD86, MHC class II) as well as a diminished secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ). However, no influence was detected on secretion of inhibitory cytokines (IL-10). Furthermore, DCs that had phagocytosed apoptotic cells were not capable of stimulating naive T cells, but induced an antigenspecific tolerance instead.

Blocking experiments with anti-Annexin I antibodies as well as addition of recombinant Annexin I revealed a role for this protein in the suppression of pro-inflammatory cytokine release and the capacity to stimulate naive T-cells. Thus, results presented in this work indicate that Annexin I acts as an anti-inflammatory signal, which suppresses immune responses towards self antigens. Thereby, the exposure of Annexin I on the surface of apoptotic cells plays a role in induction of peripheral self tolerance.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1. Apoptose – der programmierte Zelltod.....	8
2. Interaktion apoptotischer Zellen mit dem Immunsystem .....	16
3. Die Proteine der Annexin-Familie .....	26
4. Aufgabenstellung .....	33
<b>II. MATERIAL &amp; METHODEN: .....</b>	<b>35</b>
1. Material .....	35
2. Methoden .....	41
<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
1. Herstellung eines Antikörpers gegen apoptotische Zellen .....	59
2. Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen .....	63
3. Die Rolle von Annexin I auf apoptotischen Zellen in der Immunantwort .....	76
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>86</b>
1. Annexin I wird auf der Oberfläche apoptotischer Zellen präsentiert.....	87
2. Die Rolle von Annexin I bei der Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen .....	94

<b>V. ANHANG .....</b>	<b>104</b>
1. Literatur.....	104
2. Massenspektroskopische Daten .....	130
3. Abkürzungen.....	136
3. Publikationsverzeichnis.....	138
4. Lebenslauf .....	139

# I. Einleitung

## 1. Apoptose – der programmierte Zelltod

„Geboren werden bedeutet nur, zu sterben beginnen“ (Theophile Gautier). Tatsächlich ist das Leben mehrzelliger Organismen ohne Tod nicht denkbar. Ob als Spezies oder als Individuum, es besteht ein ständiges Fließgleichgewicht aus Entstehen und Vergehen. Auf der zellulären Ebene des Organismus spiegelt sich dies wider, denn Entwicklung, Wachstum und Gewebemöostase werden erst durch das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod ermöglicht. Der kontrollierten Zellproliferation steht dabei der programmierte Zelltod, die Apoptose, gegenüber. Schon 1842 hatte Carl Vogt das Phänomen eines regulierten und vorhersagbaren Zelltodes beobachtet (Vogt 1842). Anknüpfend an Untersuchungen des Embryologen Glücksmann über sterbende Embryonalzellen Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts (Glücksmann 1965) formulierten Kerr, Wyllie und Currie erstmals das Konzept eines „programmierten“, nach einem allgemeinen Muster ablaufenden Zelltodes und prägten hierfür den Begriff Apoptose (griechisch: *apoptosis* – das Herabfallen) (Kerr et al. 1972).

Mikroskopische Kennzeichen des regulierten Zelltodes sind ein Schrumpfen der Zelle, die Fragmentierung des Zellkerns sowie Membranveränderungen, die zum Ausstülpfen kleiner Membranbläschen und schließlich zur Abschnürung membranumschlossener apoptotischer Vesikel führen. Diese Reste apoptotischer Zellen werden *in vivo* innerhalb weniger Stunden von benachbarten phagozytierenden Zellen aufgenommen, so dass eine Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile durch den fortschreitenden Zerfall der sterbenden Zellen verhindert wird (Savill et al. 1993). Neben den mikroskopisch sichtbaren Veränderungen werden innerhalb der apoptotischen Zelle proteolytische Enzyme aktiviert. Diese spalten eine Vielzahl zellulärer Bestandteile, die sogenannten Todessubstrate, zu denen strukturelle Proteine, Proteine der Signaltransduktion sowie regulatorische Proteine des Zellzyklus zählen (Fischer et al. 2003). Auch die DNA wird in einem Abstand von etwa zweihundert Basenpaaren gespalten und kann elektrophoretisch als „DNA-Leiter“ in einem Agarose-Gel sichtbar gemacht und zur Bestimmung der Apoptose herangezogen werden (Wyllie et al. 1980). Die Apoptose ist eine präzise kontrollierte



Reaktion der Zelle und führt in der Regel nicht zu einer entzündlichen Immunantwort gegen das eigene Gewebe. Im Gegensatz dazu steht der als Nekrose bezeichnete, unregulierte Zelltod, der mit einer entzündlichen Immunantwort und der Zerstörung des Gewebes einhergeht (Kerr et al. 1972; Okada & Mak 2004). Nekrose tritt unter extremen Mangelsituationen auf, zum Beispiel bei Gefäßverschlüssen, Hyperthermie oder durch mechanische Schädigung der Zellmembran. Kennzeichen der Nekrose sind ein Anschwellen der Zellen bedingt durch den Ausfall der osmotischen Regelleistung, das Reißen der Zellmembran und ein unkontrollierter Austritt intrazellulärer Bestandteile. Dadurch kommt es unter anderem zur Freisetzung von ATP, Harnsäure, Hitzeschock-Proteinen und von DNA-bindenden Proteinen wie HMGB1 (High Mobility Group 1 Protein) (Hanley et al. 2004; Shi et al. 2003; Binder et al. 2000; Scaffidi et al. 2002). Im Gewebe wirken diese normalerweise nur intrazellulär auftretenden Stoffe als Gefahrensignale und können eine Immunantwort auslösen beziehungsweise unterstützen (Janeway, Jr. 1992; Matzinger 1994). Auch bei apoptotischen Zellen *in vitro* geht schließlich die Membranintegrität verloren und zytoplasmatische Bestandteile der Zellen können austreten. Dies ist jedoch ein spätes Ereignis im Verlauf der Apoptose, das deutlich nach der Aktivierung der Proteasen und den sichtbaren Membranveränderungen eintritt und demzufolge als späte Apoptose beziehungsweise sekundäre Nekrose bezeichnet wird (Wyllie et al. 1980).

Da Apoptose in aller Regel immunologisch unauffällig verläuft, können überzählige Zellen auf diese Weise gefahrlos entsorgt werden. Beispiele hierfür finden sich während der Entwicklung des Nervensystems, bei der die Anzahl der Neuronen zugunsten von Synapsen durch Apoptose reduziert wird, und während der Endphase einer Immunantwort, bei der überzählige T-Zellen durch den aktivierungsinduzierten Zelltod entfernt werden. (Oppenheim 1991; Deckwerth et al. 1996; Krammer 2000). Ebenso können potentiell schädliche Zellen, zum Beispiel Zellen mit geschädigtem Erbgut, durch Apoptose gezielt eliminiert werden (Muller et al. 1998). Die physiologische Bedeutung der Apoptose zeigt sich vor allem bei Störungen des Todesprogramms. Eine Fehlregulation der Apoptose kann einerseits ungebremstes Zellwachstum zur Folge haben und die Entstehung von Tumoren begünstigen. Andererseits kann ein verstärktes Absterben der Zellen zu degenerativen Erkrankungen führen (Krammer & Debatin 1992; Krammer et al. 1994).

## 1.1 Auslösung und Verlauf der Apoptose

Apoptose kann sowohl durch externe als auch durch interne Stimuli ausgelöst werden. Zu den externen Signalen zählen lösliche oder membrangebundene Moleküle, die vor allem zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren gehören (Locksley et al. 2001). Hierbei wird das Todessignal durch Bindung dieser Moleküle an Rezeptoren in der Zellmembran der betroffenen Zelle vermittelt. Paradigmatisch für diese Art der Interaktion steht das CD95-Rezeptor-System (Peter & Krammer 2003). In diesem gut untersuchten Beispiel löst die Bindung mindestens eines Trimers aus CD95-Liganden an drei CD95-Rezeptor-Moleküle (APO-1/Fas) die Bildung des Tod-induzierenden Signalkomplexes (englisch: *death-inducing signaling complex*, DISC) aus. Der DISC besteht aus den CD95-Rezeptoren sowie verschiedenen intrazellulären Adaptermolekülen und Enzymen (Scaffidi et al. 1999b). Über die Bindung des Adaptermoleküls FADD führt der DISC zur Aktivierung von Caspasen, einer Klasse von Cysteinproteasen (Fuentes-Prior & Salvesen 2004). Diese Enzyme liegen als Zymogene (Pro-Caspasen) in der Zelle vor und werden durch proteolytische Spaltung mit anschließender Dimerisierung aktiviert. Nach Bildung des DISC wird zunächst die als Initiatorcaspase bezeichnete Procaspase-8 an den Komplex rekrutiert und durch Autoproteolyse aktiviert. Die aktive Caspase-8 dissoziiert vom Todeskomplex und löst durch Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 eine Kaskade proteolytischer Spaltungen aus (Caspase-Kaskade), die schließlich zur Spaltung der Todessubstrate und zum Tod der Zelle führt (Lavrik et al. 2003).

Wenn interne Stimuli Apoptose auslösen, wird die Caspase-Kaskade unter Beteiligung der Mitochondrien initiiert. In diesem Fall führen intrazelluläre Stress- und Schadenssensoren wie zum Beispiel die Proteine Bim, Bax oder Bak zur Bildung von Poren in der inneren Mitochondrienmembran (Huang & Strasser 2000). Dadurch können Cytochrom c und weitere proapoptotische Moleküle aus den Mitochondrien in das Zytosol austreten (Green and John 1998). Cytochrom c bildet dort mit dem Adaptermolekül Apaf-1 und der Procaspase-9 einen multimeren, ca. 1 MD großen Komplex, das Apoptosom (Zou et al. 1997; Adams & Cory 2002). Analog zur Aktivierung der Procaspase-8 am DISC wird durch Bildung des Apoptosoms die Procaspase-9 und in Folge die Caspase-Kaskade aktiviert. Die Aktivierung der Effektorcaspasen und die damit verbundene Spaltung struktureller Bestandteile des

Zellgerüsts führt schließlich zu den mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellmembran und zur Bildung apoptotischer Vesikel (Janicke et al. 1998).

Ein weiteres Kennzeichen apoptotischer Zellen in einem frühen Stadium ist die Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin auf der äußeren Seite der Zellmembran (Fadok et al. 1992b; Martin et al. 1995). Das negativ geladene Phospholipid ist bei lebenden Zellen größtenteils auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert, während sich vornehmlich neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf der Außenseite befinden (Bretscher 1972; Rothman & Lenard 1977). Dieser Lipidgradient wird in lebenden Zellen durch eine energieabhängige Aminophospholipid-Translokase aufrechterhalten, die stereospezifisch Phosphatidylserin und mit geringerer Affinität auch Phosphatidylethanolamin von der äußeren Schicht der Plasmamembran zur inneren transportiert (Seigneuret & Devaux 1984). Nach einem apoptotischen Stimulus wird die Translokase abgeschaltet (Tang et al. 1996; Verhoven et al. 1995). Zusätzlich wird eine sogenannte Scramblase aktiviert, welche die Lipide der Membran gleichmäßig in der Membran-Doppelschicht verteilt (Williamson et al. 1992; Verhoven et al. 1995; Williamson & Schlegel 2002).

Die Aktivierung der Scramblase unter apoptotischen Bedingungen wird maßgeblich von extrazellulärem Kalzium und Caspase-Aktivität beeinflusst (Verhoven et al. 1999). So kann Scramblase-Aktivität und die Externalisierung von Phosphatidylserin in lebenden Zellen allein durch einen Kalziumeinstrom induziert werden. Unter apoptotischen Bedingungen kann die Phosphatidylserin-Externalisierung allerdings nur durch die Chelatierung des extrazellulären Kalziums, nicht aber durch intrazelluläre Kalzium-Chelatoren blockiert werden (Hampton et al. 1996; Verhoven et al. 1999). Da das Enzym selbst bisher nicht identifiziert wurde, konnten die weiteren Umstände dieses scheinbaren Widerspruchs bisher nicht genauer untersucht werden. Auch Caspase-Aktivität scheint bei der Externalisierung von Phosphatidylserin eine Rolle zu spielen (Verhoven et al. 1999). So führte die Behandlung der Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk zu einer reduzierten Scramblase-Aktivität. Dieser Effekt war jedoch abhängig von dem verwendeten apoptotischen Stimulus und trat nach Glucocorticoid-induzierter Apoptose nicht auf. Daher scheint die Phosphatidylserin-Exposition in apoptotischen Zellen nicht unmittelbar durch Caspase-Aktivität bedingt zu sein. Ein mittelbarer Einfluss aktivierter Caspasen auf die Phosphatidylserin-Exposition bei physiologischer

Auslösung der Apoptose (durch zum Beispiel die Aktivierung von TNF- $\alpha$ -Rezeptoren oder des T-Zell-Rezeptors) ist aber in den oben angegebenen Untersuchungen gut belegt. Neben der Scramblase-Aktivität tragen auch Enzyme aus der Klasse der ABC-Transporter zur Modulation der apoptotischen Membranoberfläche bei, da Zellen von ABC1-knockout-Mäusen eine um 50 Prozent verminderte Exposition von Phosphatidylserin nach einem apoptotischen Stimulus aufweisen (Hamon et al. 2000).

Die Exposition von Phosphatidylserin erfolgt auf diese Weise sehr früh im apoptotischen Prozess – noch vor der Spaltung der DNA und bevor die sterbende Zelle in die sekundäre Nekrose übergeht und die Membranintegrität verliert (Verhoven et al. 1995). Bei nekrotischen Zellen hingegen tritt durch Energiemangel und Diffusion der Membranlipide ebenfalls eine Gleichverteilung der Lipide auf. Hierbei handelt es sich jedoch um einen ungeregelten Prozess, der sehr schnell zur Zerstörung der Zellmembran führt.

### 1.2 Phagozytose apoptotischer Zellen

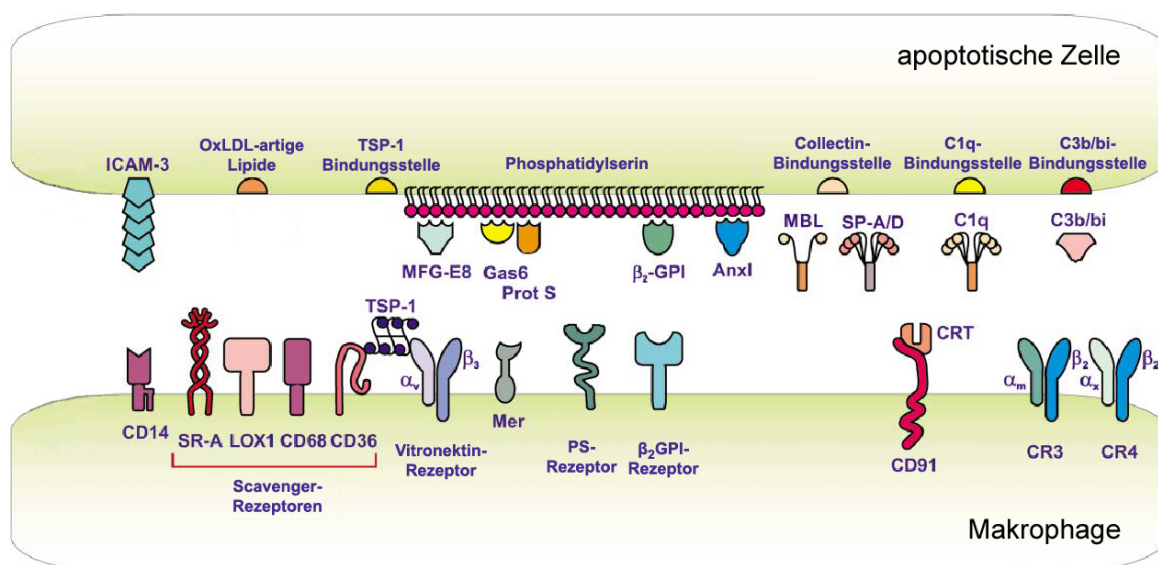
Im Organismus lassen sich nur wenige apoptotische Zellen nachweisen, da die sterbenden Zellen im Regelfall schnell von benachbarten phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Zu diesen zählen vor allem professionelle Phagozyten wie Gewebemakrophagen und dendritische Zellen sowie ferner Hepatozyten und Zellen des Endothels (Franc 2002; Wood et al. 2000; Parnaik et al. 2000). Die Aufnahme apoptotischer Zellen erfolgt hauptsächlich über Signalmoleküle auf der Zelloberfläche, die nach Induktion der Apoptose auftreten und die sterbenden Zellen von anderen, lebenden Zellen unterscheiden. Diesen auch als „*Eat-Me*-Signale“ bezeichneten Strukturen stehen jeweils entsprechende Rezeptoren auf der Seite der aufnehmenden Zelle gegenüber (siehe Abb.1.1). Als prominentes Beispiel eines *Eat-Me*-Signales gilt die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der apoptotischen Zellmembran (Fadok et al. 1992b). Es ist allerdings nicht abschließend geklärt, ob das Lipid für diese Funktion zusätzlich in einer besonderen Form – zum Beispiel aggregiert oder oxidiert – vorliegen muss (Kagan et al. 2002). Für das Lipid wurde ein potentieller Rezeptor auf Makrophagen beschrieben, der Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) (Fadok et al. 2000). Die Bedeutung des PSR für die Phagozytose apoptotischer Zellen wird jedoch kontrovers diskutiert, da in einer

der beiden PSR-defizienten Mauslinien kein Defekt bei der Phagozytose apoptotischer Zellen nachgewiesen werden konnte (Li et al. 2003; Bose et al. 2004). Auch ein anderes Lipid, Lysophosphatidylcholin, wird durch die Aktivität der induzierbaren Phospholipase A<sub>2</sub> in der Membran apoptotischer Zellen produziert (Kim et al. 2002). Dieses Lipid wird zusätzlich sekretiert und wirkt als chemotaktisches Signal für Makrophagen, die so zu den sterbenden Zellen geleitet werden (Lauber et al. 2003).

Neben der veränderten Lipidzusammensetzung der apoptotischen Membran sind nur wenige direkte Veränderungen von Molekülen auf der Oberfläche apoptotischer Zellen bekannt. Hierzu zählen eine apoptose-spezifische Form des Moleküls ICAM3 (Moffatt et al. 1999), die Oxidation von Lipiden, wie sie auch auf Partikeln der *Low Density* Lipoproteine vorkommt (Chang et al. 1999), und die Modifizierung von Zuckerstrukturen (Eda et al. 2004; Azuma et al. 2002; Beaver & Stoneman 1999).

Bei den meisten beschriebenen *Eat-Me*-Signalen handelt es sich jedoch um lösliche Brückenmoleküle, die an Moleküle auf apoptotischen Zellen binden und über einen eigenen Rezeptor die Aufnahme der auf diese Weise markierten Zellen vermitteln. Die Bindungsstelle dieser Moleküle auf der apoptotischen Zelle ist oftmals das exponierte Phosphatidylserin, zum Beispiel im Fall der Proteine *Growth Arrest Specific 6* (Gas6),  $\beta$ 2-Glycoprotein I ( $\beta$ 2-GPI), Protein S und *Milk Fat Globulin E8* (MFG-E8). Diese Proteine liegen entweder bereits im Serum vor oder werden wie im Fall von MFG-E8 von den Makrophagen selbst sekretiert (Hanayama et al. 2002). Einen Sonderfall unter den Brückenmolekülen bildet das zytosolische, lipidbindende Protein Annexin I (Anx I), da es von der apoptotischen Zelle selbst und nicht aus dem Serum oder von Nachbarzellen stammt. Wie Phosphatidylserin wird auch Annexin I im Verlauf der Apoptose auf der Oberfläche der sterbenden Zellen exponiert, wo es wie viele andere Brückenmoleküle an Phosphatidylserin bindet und möglicherweise die Aufnahme der apoptotischen Zelle vermittelt (Arur et al. 2003). Bisher konnte jedoch weder der Mechanismus der Externalisierung von Annexin I noch der Rezeptor für Annexin I auf Seite der Makrophagen näher identifiziert werden. Für andere Brückenmoleküle sind die Bindungsstellen auf der apoptotischen Zelle bisher nicht oder nur ungenügend charakterisiert. Dies gilt beispielsweise für Thrombospondin, für verschiedene Proteine aus der Klasse der Collectine (zum Beispiel Mannan-bindendes Lectin (MBL) und die *Surfactant* Proteine A und D), für Proteine des Komplementsystems (C1q, C3b) und für natürliche Antikörper (IgM)

(Stern et al. 1996; Ogden et al. 2001; Takizawa et al. 1996; Vandivier et al. 2002; Korb & Ahearn 1997; Quartier et al. 2005). Die Rezeptoren auf Seite der Phagozyten sind demgegenüber vielfach bekannt. So bindet das Protein MFG-E8 an den Vitronektin-Rezeptor von Makrophagen, während die Proteine Gas6 und Protein S an einen Rezeptor der Mer-Tyrosinkinase-Familie binden (Anderson et al. 2003; Ishimoto et al. 2000). Die Collectine, ursprünglich charakterisiert als Bestandteile der angeborenen Immunität bei der Aufnahme bakterieller Partikel (van de Wetering et al. 2004), führen zur Aufnahme apoptotischer Zellen über den Calreticulin (CRT)-CD91-Komplex (Vandivier et al. 2002).



**Abb. I.1: Liganden und Rezeptoren für die Aufnahme apoptotischer Zellen.** Dargestellt sind die verschiedenen Rezeptoren für die Aufnahme apoptotischer Zellen sowie ihre Liganden und Bindungsstellen auf apoptotischen Zellen. Weitere Erläuterungen siehe Text (verändert nach Lauber et al. 2004).

Bei Betrachtung der oben genannten Rezeptoren und vieler Brückenmoleküle des Serums wird deutlich, wie sehr die Mechanismen für die Aufnahme apoptotischer Zellen jenen der Aufnahme von Bakterien ähneln. Viele der Moleküle, die bei der Aufnahme apoptotischer Zellen eine Rolle spielen, vermitteln gleichfalls die Phagozytose bakterieller Bestandteile während einer Entzündung. Ein gutes Beispiel hierfür sind die Komplement-Rezeptoren CR3 und CR4 und die sogenannten *Scavenger-Rezeptoren* (SR-A, LOX1, CD68 und CD36), die bei einer bakteriellen Infektion an komplement-opsonierte Immunkomplexe beziehungsweise Bestandteile

der bakteriellen Zellmembran binden (Peiser et al. 2002). Auch der LPS-Rezeptor CD14 bindet sowohl Lipopolysaccharid als auch ICAM3 auf apoptotischen Zellen. Unter inflammatorischen Bedingungen werden die Makrophagen von diesen Rezeptoren aktiviert und fördern den entzündlichen Prozess durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1, -6 und -12. Die Aktivierung der gleichen Rezeptoren in einem apoptotischen Kontext, nämlich bei Bindung an Komplement, an oxidierte Lipide und an ICAM3 auf der Oberfläche apoptotischer Zellen führt dagegen nicht zu einer entzündlichen Reaktion der Makrophagen (Oka et al. 1998; Erdosova et al. 2002; Platt et al. 1999; Ren et al. 1995). Stattdessen werden bei der Aufnahme apoptotischer Zellen anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 und TGF- $\beta$  ausgeschüttet (Fadok et al. 1998). Die Unterschiede bei der Aufnahme von Bakterien und apoptotischen Zellen sind trotz der Beteiligung gleicher Moleküle auf molekularer Ebene bisher weitgehend unklar – sie lassen sich aber schon bei der Phagozytose beobachten, denn Bakterien und apoptotische Zellen werden in zwei verschiedenen Arten von Phagosomen aufgenommen und abgebaut (Blander & Medzhitov 2004).

Nicht alle der genannten Rezeptor-Liganden-Systeme werden gleichzeitig zur Aufnahme apoptotischer Zellen benötigt. Studien mit blockierenden Antikörpern zeigen *in vitro* eine Redundanz der verschiedenen Systeme, da die Phagozytose von den Antikörpern jeweils nur teilweise blockiert wird (Verbovetski et al. 2002; Devitt et al. 1998; Moffatt et al. 1999; Chang et al. 1999; Ogden et al. 2001). Hinzu kommt, dass auf die Bindung an Makrophagen nicht immer auch die Aufnahme der Partikel folgt (Hoffmann et al. 2001). Eine besondere Bedeutung kommt daher der Analyse der Phagozytose apoptotischer Zellen *in vivo* zu.

In genetisch veränderten Mäusen mit einer Defizienz für die Brückenmoleküle C1q, MFG-E8 oder MBL beziehungsweise für die Rezeptoren CD14 oder die Mer-Tyrosinkinase kann ein vermehrtes Auftreten apoptotischer Zellen beobachtet werden (Botto et al. 1998; Stuart et al. 2005; Hanayama et al. 2004; Cohen et al. 2002). Auch hier zeigt sich sowohl eine Redundanz als auch eine Divergenz der untersuchten Mechanismen, denn einerseits variieren die beobachteten Phagozytose-Defekte erheblich (30 bis 80 Prozent verminderte Phagozytose), andererseits führt dies nur in einigen der untersuchten Maus-Modelle zu Störungen des Immunsystems in Form von Autoimmunkrankheiten. Dennoch zeigt die enge Assoziation von Phagozytose-Defekten und dem Auftreten von

Autoimmunkrankheiten die Bedeutung der schnellen und immunologisch unauffälligen Aufnahme apoptotischer Zellen (Rosen & Casciola-Rosen 2001). Die Vielfalt und Komplexität der bisher beschriebenen Rezeptor-Liganden-Systeme für die Aufnahme apoptotischer Zellen reflektieren augenscheinlich die unterschiedlichen Bedingungen bei der Aufnahme apoptotischer Zellen innerhalb der verschiedenen Gewebe des Körpers, abhängig von der Art der phagozytierenden wie auch der apoptotischen Zelle (Lauber et al. 2004; Pradhan et al. 1997).

## 2. *Interaktion apoptotischer Zellen mit dem Immunsystem*

Apoptotische Zellen treten vor allem im Rahmen der Gewebemöostase auf, sie können aber auch durch äußere Einflüsse, zum Beispiel nach einem Sonnenbrand, in hoher Zahl entstehen. Vaux und Korsmeyer zufolge müssen täglich ca. acht Milliarden apoptotische Zellen aufgenommen und entfernt werden, ohne dass es zur Auslösung einer Immunantwort gegen eigenes Gewebe kommen darf (Vaux & Korsmeyer 1999). Die Aufnahme und Entfernung apoptotischer Zellen wird zum größten Teil von professionellen Phagozyten, den Makrophagen und dendritischen Zellen, geleistet (Parnaik et al. 2000). Dieselben Zellen spielen als professionelle antigenpräsentierende Zellen auch eine zentrale Rolle bei der Auslösung einer Immunantwort nach Aufnahme körperfremder Partikel. Damit die Aktivierung autoreaktiver Immunzellen gegen eigenes Gewebe – nach Paul Ehrlich der "*horror autotoxicus*" (Dale et al. 1956) – vermieden wird, existieren Toleranzmechanismen auf Seite der antigenpräsentierenden Zellen wie auch bei der Entwicklung und Aktivierung der Effektor-T- und B-Zellen. Diese gewährleisten im Regelfall, dass eine Immunantwort nur gegen fremde Pathogene aber nicht gegen eigenes Gewebe ausgelöst wird.

### 2.1 **Auslösung einer Immunantwort**

Eindringende pathogene Erreger können vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Die Effektormechanismen des Immunsystems teilen sich in den evolutionär älteren Zweig der angeborenen Immunität und in den neueren Zweig der erworbenen Immunität auf [Übersicht bei Janeway 2001]. Zur angeborenen Immunität zählen



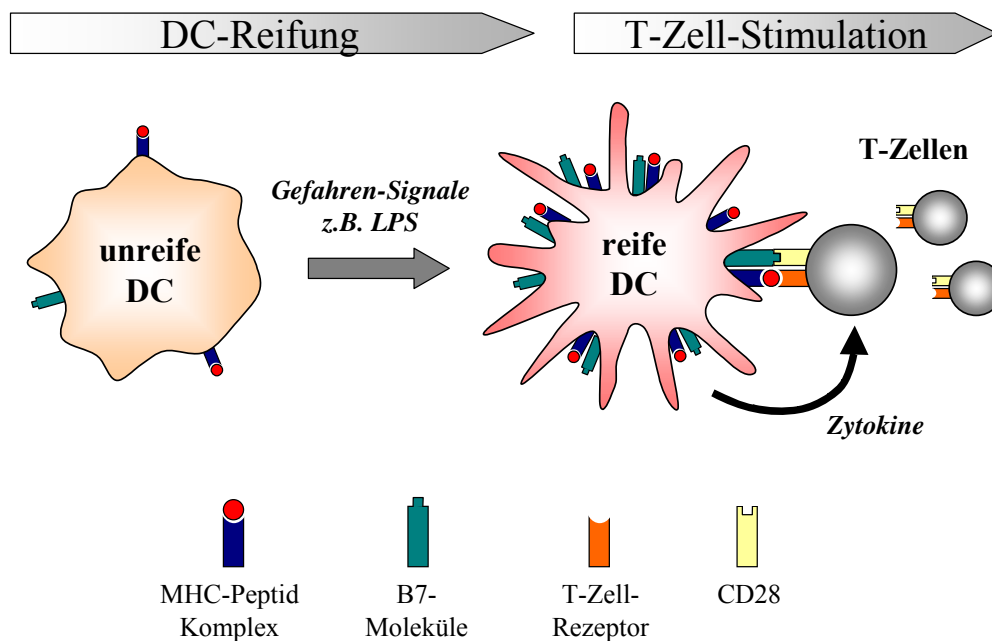
antibakterielle Peptide und Proteine, zum Beispiel das Lysozym im Speichel, die Cryptidine des Dünndarms und die Komplementproteine im Blutserum, welche durch Bindung an die Erreger unmittelbar zur deren Lyse führen. Darüber hinaus existieren spezialisierte Immunzellen wie Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten, die als Phagozyten in der Lage sind, eingedrungene Erreger aufzunehmen und zu eliminieren. Zusammen gewährleisten die Mechanismen der angeborenen Immunität einen schnellen, ersten Schutz gegen eindringende Pathogene. Für die Identifizierung und Aufnahme der Erreger besitzen die Zellen des angeborenen Immunsystems Rezeptoren, die vor allem häufig vorkommende und repetitive Erregerstrukturen erkennen können. Zu diesen Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (Janeway, Jr. 1989) zählen unter anderem Oberflächenmoleküle grampositiver und gramnegativer Bakterien (Lipoteichonsäure bzw. Lipopolysaccharid) sowie Strukturen von Hefen (Taylor et al. 2005).

Das Charakteristikum der erworbenen, adaptiven Immunantwort ist hingegen die Entwicklung hochspezifischer Rezeptoren, die gegen einzelne Molekülfragmente eines Erregers gerichtet sind. Zu den Effektorzellen der adaptiven Immunität zählen die T- und B-Zellen, von denen jede einen einzigartigen Rezeptor einer bestimmten Spezifität trägt (T- bzw. B-Zell-Rezeptor). Durch somatische Rekombination der Rezeptorgene kommt es zu einer großen Vielfalt unterschiedlicher Rezeptoren und damit notwendigerweise zu einer geringen Anzahl von Zellen, die gegen einen bestimmten Erreger reagieren können. Daher müssen diese wenigen spezifischen Zellen der adaptiven Immunantwort zunächst aktiviert und zur Teilung gebracht werden. Im Falle der T-Zellen erfolgt dies durch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC), zu denen vor allem dendritische Zellen zählen (Inaba et al. 1990).

Dendritische Zellen befinden sich in Geweben, die dem Kontakt mit eindringenden Pathogenen in besonderem Maße ausgesetzt sind – so in der Haut (Langerhanszellen), in den Atemwegen, im Blut, in den Interstitialräumen vieler weiterer Gewebe und in der afferenten Lymphe (Maldonado-Lopez & Moser 2001). Als „Wächter“ des Immunsystems können dendritische Zellen Antigene aus ihrer Umgebung über eine Vielzahl phagozytischer Rezeptoren aufnehmen – hierzu zählen unter anderem die Rezeptoren DC-SIGN, DEC-205, Langerin, der Mannose-Rezeptor sowie Fc- und Komplement-Rezeptoren (Guermontprez et al. 2002). Die Antigene werden in der Zelle prozessiert und die resultierenden Peptidfragmente gebunden an Proteine des *major histocompatibility complex* (MHC) auf der

Oberfläche präsentiert (Trombetta & Mellman 2005). Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus MHC-Protein und Peptid. Dadurch kommt es zur Auslösung einer Signalkaskade in der T-Zelle und letztlich zur Proliferation (Gascoigne & Zal 2004; van Leeuwen & Samelson 1999). Um eine naive, das heißt bisher noch nicht stimulierte T-Zelle zu aktivieren, muss dieses erste Signal des T-Zell-Rezeptors allerdings von einem zweiten, kostimulatorischen Signal komplementiert werden. Zu den kostimulatorischen Rezeptoren der T-Zellen zählt vor allem das Molekül CD28, welches an Moleküle der B7-Familie (vor allem CD80 und CD86) auf Seiten der dendritischen Zellen bindet. Ohne Kostimulation hingegen werden die T-Zellen inaktiviert (Greenwald et al. 2005; Macian et al. 2004).

Ort der Interaktion von T-Zellen und dendritischen Zellen sind die sekundären lymphatischen Organe, die fortwährend von naiven T-Zellen durchwandert werden. Dendritische Zellen hingegen befinden sich im unreifen Zustand im Gewebe, zum Beispiel die Langerhanszellen in der Haut. Kommt es lokal zu einer Vermehrung pathogener Erreger, so treten im Gewebe verstärkt Gefahrensignale wie bakterielles LPS oder virale Einzelstrang-DNA auf, die zur Aktivierung der dendritischen Zellen über die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) führen (Matzinger 1994; Janeway, Jr. & Medzhitov 2002). Auch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und die Aktivierung des CD40-Rezeptors durch Bindung an CD40-Liganden auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen können dendritische Zellen aktivieren (Caux et al. 1994). Durch diese Aktivierung werden die dendritischen Zellen mobilisiert und wandern in die lymphatischen Organe ein. Gleichzeitig exprimieren sie verstärkt die kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie und sekretieren pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-12. Erst durch diese Reifung werden die dendritischen Zellen in die Lage versetzt, naive T-Zellen effizient zu stimulieren (siehe Abb. I.2). Sie gehören zu den wichtigsten Zellen bei der Auslösung einer adaptiven Immunantwort (Banchereau et al. 2000).



**Abb. I.2: Reifung dendritischer Zellen und Interaktion mit T-Zellen.** Nach Aktivierung durch Gefahrensignale wie LPS kommt es zur Reifung der dendritischen Zellen (DC). Dadurch werden verstärkt MHC-Peptid-Komplexe und kostimulatorische Moleküle aus der B7-Familie auf der Oberfläche exprimiert. Durch Bindung dieser Moleküle an den T-Zell-Rezeptor beziehungsweise CD28-Moleküle und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine werden naive T-Zellen von reifen dendritischen Zellen stimuliert.

## 2.2 Mechanismen der Toleranzentwicklung

Die Zellen der angeborenen Immunität besitzen Rezeptoren mit Spezifitäten für häufig vorkommende Erreger-Strukturen, die in dieser Art nicht auf den körpereigenen Zellen auftreten. Rezeptoren auf Zellen der adaptiven Immunantwort hingegen können potentiell auch an MHC-Peptid-Komplexe von körpereigenen Proteinen binden. Dies ist bedingt durch die zufällige Umordnung der T- und B-Zell-Rezeptor-Gene, bei der es in ca. 20 bis 50 Prozent aller Fälle zur Entstehung von autoreaktiven Zellen kommt, die zu einer fatalen Zerstörung von körpereigenem Gewebe führen können (Ignatowicz et al. 1996; Zerrahn et al. 1997). Wie bereits von Paul Ehrlich und später Francis McFarlane Burnet (in dem Konzept der „Klonalen Deletion“) postuliert (Dale et al. 1956; Burnet 1959), existieren daher Kontrollmechanismen, welche die Reifung und Aktivierung autoreaktiver Zellen verhindern und die Toleranz der Immunantwort gegen eigenes Gewebe gewährleisten.

### 2.2.1 Zentrale Toleranz

In der Regel werden autoreaktive B- und T-Zellen bereits früh in ihrer Entwicklung eliminiert. Während ein Großteil der autoreaktiven B-Zellen bereits im Knochenmark eliminiert beziehungsweise inaktiviert wird (Goodnow et al. 1988; Wardemann et al. 2003), führt bei T-Zellen die negative Selektion im Thymus zur Apoptose derjenigen Zellen, deren Rezeptoren mit hoher Affinität an MHC-Moleküle mit gebundenen Selbstpeptiden binden. Die entsprechenden Peptid-MHC-Komplexe befinden sich auf der Oberfläche antigenpräsentierender dendritischer Zellen im zentralen Teil des Thymus, der Medulla. Zu den antigenpräsentierenden Zellen der negativen Selektion zählen neben dendritischen Zellen vor allem spezialisierte Thymus-Epithelzellen (TECs) (Palmer 2003). Um T-Zell-Toleranz gegen ein möglichst breites Spektrum körpereigener Proteine zu ermöglichen, wird im medullären Thymusepithel die ansonsten strikte gewebe- und entwicklungsbeschränkte Regulation der Genexpression aufgehoben. Durch die Wirkung von Transkriptionsfaktoren wie AIRE (Autoimmune Regulator) werden in den TECs auch Proteine exprimiert, die ansonsten nur in bestimmten spezialisierten Geweben vorkommen, zum Beispiel das Insulin der Bauchspeicheldrüse (Anderson et al. 2002). Insgesamt können Proteine aus sehr vielen Geweben und verschiedenen Entwicklungsstadien in den TECs nachgewiesen werden, so dass ein umfangreicher Schutz gegen autoreaktive T-Zellen bereits bei der Selektion der T-Zellen im Thymus gewährleistet wird (Derbinski et al. 2001).

Durch die Selektionsprozesse im Thymus werden mehr als 95 Prozent aller T-Zellen eliminiert (Shortman et al. 1990). Dennoch überstehen einige autoreaktive T-Zellen die Selektion und wandern in die Peripherie (Bouneaud et al. 2000). Hierbei handelt es sich vor allem um T-Zellen mit einer geringen Affinität für Autoantigene (Liu et al. 1995a). Aufgrund dieser geringen Affinität, und da viele Autoantigene in der Peripherie nicht oder nicht in ausreichender Konzentration für T-Zellen zugänglich sind, werden die autoreaktiven T-Zellen normalerweise nicht aktiviert und richten keinen Schaden an, ein Zustand, der als „Ignoranz“ bezeichnet wird (Kurts et al. 1999). Durch pro-inflammatorische Stimuli kann diese Ignoranz jedoch gebrochen werden (Ohashi et al. 1991; Voehringer et al. 2000). Um dies zu verhindern, können autoreaktive T-Zellen auch noch in der Peripherie eliminiert oder inaktiviert werden.

### 2.2.2 Periphere Toleranz

Treffen autoreaktive T-Zellen in der Peripherie auf Körperzellen mit ihrem entsprechenden Antigen, so bekommt die Zelle zwar ein Signal über ihren T-Zell-Rezeptor, nicht jedoch über den Korezeptor CD28, weil den meisten Körperzellen der entsprechende Ligand aus der B7-Familie fehlt. Ohne Kostimulation führt das T-Zell-Rezeptor-Signal aber nicht zur Aktivierung der T-Zelle, sondern versetzt sie in einen unreaktiven Zustand, die Anergie (Schwartz 2003; Macian et al. 2004). Anergie T-Zellen sind nicht mehr in der Lage, ihre spezifischen Effektor-Funktionen auszuführen, sie sterben schnell und sind daher unschädlich für den Organismus.

Im Gegensatz dazu können autoreaktive T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen an MHC-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche professioneller antigenpräsentierender Zellen wie der dendritischen Zellen binden. In diesem Fall können B7-Moleküle der dendritischen Zellen über den CD28-Korezeptor das notwendige zweite Signal zur T-Zell-Aktivierung geben. Daher ist die Expression der B7-Moleküle auf den dendritischen Zellen reguliert. Im unreifen Zustand und in Abwesenheit von Gefahrensignalen weisen die dendritischen Zellen nur eine geringe Expression der B7-Moleküle auf, die für eine vollständige Aktivierung von T-Zellen nicht ausreicht. Stattdessen können die unreifen dendritischen Zellen in den T-Zellen eine limitierte Aktivierung auslösen, die zur Deletion der reaktiven T-Zellen führt (Morgan et al. 1999). Kennzeichen dieser "zerstörerischen" Aktivierung sind wenige Zellteilungen und das Ausbleiben der Sekretion von T-Zell-Zytokinen wie Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4 und Interleukin-10 (Hawiger et al. 2001). Im „*steady state*“ (physiologischer Zustand der Gewebemöostase) – das heißt in Abwesenheit von Infektionen und Gefahrensignalen – sind die meisten dendritischen Zellen in sekundären lymphatischen Organen unreif (Inaba et al. 1994; Henri et al. 2001; Leenen et al. 1998). Daher können diese Zellen autoreaktive T-Zellen in der Peripherie beseitigen und auf diese Weise die Toleranzinduktion im Thymus ergänzen.

Eine weitere Instanz der peripheren Toleranz stellen die sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen dar. Diese Zellen entstehen im Thymus und bilden eine eigene T-Zelllinie, die durch Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3, der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie durch eine konstitutive Expression des Moleküls CTLA4 gekennzeichnet ist (Sakaguchi 2004). Regulatorische T-Zellen sind *in vitro* in der Lage, die durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors ausgelöste

Proliferation und die Interleukin-2-Sekretion von CD25 negativen, naiven T-Zellen zu unterdrücken. *In vivo* supprimieren sie verbliebene autoreaktive T-Zellen, die ansonsten körpereigenes Gewebe angreifen könnten. Dies wird deutlich, wenn die regulatorischen T-Zellen künstlich aus dem Organismus entfernt werden oder ihre Entstehung durch neonatale Entfernung des Thymus verhindert wird. Bei den entsprechenden Mäusen zeigen sich organspezifische Autoimmunkrankheiten, die sich bei Re-Infusion regulatorischer T-Zellen wiederum zurückbilden (Powrie et al. 1993). Der Verlust von Toleranz gegen eigenes Gewebe und damit das Auftreten von Autoimmunkrankheiten kann in Mäusen allein durch die Anwesenheit beziehungsweise Übertragung regulatorischer T-Zellen verhindert werden, daher sind diese Zellen direkte Träger einer dominanten Toleranz.

Der molekulare Mechanismus der Hemmung durch regulatorische T-Zellen *in vivo* wie *in vitro* ist bisher nicht genau bekannt. Während in einigen Modellen von Autoimmunerkrankungen (zum Beispiel bei entzündlichen Darmerkrankungen) die Sekretion der inhibitorischen Zytokine TGF- $\beta$  und Interleukin-10 eine wichtige Rolle spielt (Nakamura et al. 2004; Asseman et al. 1999), ist bei anderen Krankheitsmodellen und bei der Suppression der Proliferation *in vitro* der direkte Zellkontakt nötig (Read et al. 1998; Thornton & Shevach 1998). In jedem Fall wird die initiale, produktive Aktivierung der naiven, CD25-negativen T-Zellen verhindert, so dass keine Interferon- $\gamma$  produzierenden Effektor-T-Zellen gebildet werden (Walker et al. 2003).

Die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus lässt sich auf T-Zellen mit einem hoch affinen T-Zell-Rezeptor zurückführen. Sie erfolgt während der negativen Selektion unter Beteiligung von antigenpräsentierenden Zellen epithelialen und hämatopoietischen Ursprungs, deren genaue Identität noch nicht geklärt ist. (Jordan et al. 2001; Apostolou & von Boehmer 2004). Weiterhin gibt es Hinweise, dass regulatorische T-Zellen auch in der Peripherie aus CD4-positiven, CD25-negativen Zellen entstehen können (Apostolou et al. 2002; Chen et al. 2003). Eine wichtige Rolle bei dieser peripheren Induktion von regulatorischen T-Zellen wird wiederum den dendritischen Zellen zugesprochen. Hinweise dafür ergeben sich aus Studien, in denen die Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen verhindert wird. Bei Blockierung der kostimulatorischen Signale dendritischer Zellen *in vivo*, zum Beispiel durch Antikörper gegen ICOS, ICOS-Ligand oder im Fall von B7-defizienten Mäusen, können keine regulatorischen T-Zellen und damit keine Toleranz gegen periphere

Antigene erzeugt werden (Akbari et al. 2002; Liang et al. 2005; Lohr et al. 2003). Die genaue Identität der Toleranz-induzierenden dendritischen Zellen ist allerdings nicht abschließend geklärt. Einigen Untersuchungen zufolge genügt *in vitro* bereits eine längere Kokultur von unreifen dendritischen Zellen mit naiven, CD25-negativen T-Zellen, um die Differenzierung regulatorischer T-Zellen aus naiven T-Zellen zu induzieren (Jonuleit et al. 2000). Auch im Menschen kann die Injektion antigenbeladener, unreifer dendritischer Zellen zu einer Expansion von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften führen (Dhodapkar & Steinman 2002).

Neben unreifen dendritischen Zellen sind verschiedene andere Phänotypen dendritischer Zellen mit tolerogenem Potential beschrieben. So führt die Behandlung unreifer dendritischer Zellen mit TNF- $\alpha$  *in vitro* zu einer teilweisen Reifung der dendritischen Zellen. Diese "semi-reifen" dendritischen Zellen weisen eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie von MHC-Molekülen auf, aber sie sekretieren keine pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin-12 (Menges et al. 2001; Verginis et al. 2005). Wie unreife dendritischen Zellen sind auch TNF- $\alpha$ -behandelte dendritische Zellen in der Lage, Autoimmunkrankheiten durch Induktion regulatorischer T-Zellen zu unterdrücken. Sie ähneln dendritischen Zellen, die im *steady state* nach Aufnahme von Antigenen in die Lymphknoten wandern (Ruedl et al. 2000; Brand et al. 1999), und unterscheiden sich durch die relativ hohe Expression der genannten kostimulatorischen Moleküle von gänzlich unreifen dendritischen Zellen im Gewebe (Lutz & Schuler 2002). Auch durch *in vitro*-Behandlung mit Interleukin-10 konnten Monozyten zu tolerogenen dendritischen Zellen differenziert werden, welche anschließend die Entwicklung regulatorischer T-Zellen aus naiven T-Zellen induzierten (Steinbrink et al. 2002). Eine Bedeutung des Zytokins Interleukin-10 bei der Induktion peripherer Toleranz wird auch durch Experimente *in vivo* nahegelegt. So konnten nach intranasaler Gabe von Antigen tolerogene, pulmonale dendritische Zellen isoliert werden. Diese Zellen waren durch die Sekretion von Interleukin-10 und eine hohe Expression der Moleküle CD80, CD86 und ICOS-Ligand gekennzeichnet, während die Expression von MHC-Molekülen nur ein mittleres Niveau erreichte (Akbari et al. 2001). Durch eine Kokultur dieser tolerogenen dendritischen Zellen mit naiven CD4-positiven T-Zellen entstanden Interleukin-10 produzierende regulatorische T-Zellen, die ihrerseits eine experimentelle Entzündung der Luftwege unterdrückten.

Insgesamt ist die Kontrolle beziehungsweise Hemmung autoreaktiver T-Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen sowie der Einfluss dendritischer Zellen auf Entwicklung und Aktivierung der regulatorischen T-Zellen in einer Vielzahl von experimentellen Systemen belegt worden. Unklar sind jedoch zur Zeit noch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Interaktionen zwischen dendritischen Zellen, regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen.

### 2.3 Einfluss apoptotischer Zellen auf die Immunantwort

Die Aufnahme der täglich anfallenden apoptotischen Zellen durch Makrophagen und dendritische Zellen führt nicht nur zur effizienten Beseitigung aus dem Organismus, sie führt auch zur Präsentation vieler potentiell gefährlicher Autoantigene durch die Phagozyten. Die aufgenommenen, zellgebundenen Proteine werden äußerst effizient in dendritischen Zellen prozessiert und auf MHC-Molekülen präsentiert (Schulz & Reis e Sousa 2002; Li et al. 2001b; Scheffer et al. 2003). Zudem verbleiben nicht alle dendritischen Zellen resident im peripheren Gewebe, sondern können mit aufgenommenem apoptotischen Material in den ableitenden Lymphknoten vieler Gewebe nachgewiesen werden (Huang et al. 2000; Hemmi et al. 2001; Mishima 1966; Inaba et al. 1998). Bei gleichzeitigem Auftreten von Gefahrensignalen – zum Beispiel durch eine Infektion – könnten die mit Autoantigenen beladenen dendritischen Zellen im Lymphknoten auf autoreaktive T-Zellen treffen und diese aktivieren (Albert et al. 1998b). Es besteht folglich die ständige Gefahr einer Autoimmunantwort gegen Peptide aus den aufgenommenen apoptotischen Zellen, der „*horror autotoxicus*“ (Steinman & Nussenzweig 2002).

Obwohl das Auftreten von Autoimmunerkrankungen tatsächlich mit Infektionen und damit mit dem Auftreten von Gefahrensignalen korreliert (Wucherpfennig 2001; Waldner et al. 2004; Anders et al. 2004), beträgt die Prävalenz von Autoimmunerkrankungen in der Bevölkerung nur drei bis acht Prozent (Jacobson et al. 1997). Daher wird angenommen, dass die Aufnahme apoptotischer Zellen einen suppressiven Effekt auf dendritische Zellen ausübt, der die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verhindert und so zur peripheren Toleranz gegen eigenes Gewebe beiträgt (Skoberne et al. 2005). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen *in vitro* die anschließende Reifung der dendritischen Zellen durch LPS und in Folge die Stimulation von T-Zellen inhibiert (Ip



& Lau 2004; Stuart et al. 2002). Auch *in vivo* konnte durch Injektion apoptotischer, Antigen-gekoppelter Milzzellen Toleranz induziert werden (Ferguson et al. 2002). Die Toleranzentwicklung war in diesem Fall abhängig von funktionellen CD95-Rezeptoren und konnte durch Inhibition der Apoptose verhindert werden. In einem weiteren Maus-Modell konnte durch die gezielte Auslösung einer begrenzten Apoptose in  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Zerstörung dieser Zellen durch autoreaktive T-Zellen und damit die Entstehung eines *Diabetes mellitus* verhindert werden (Hugues et al. 2002).

Andererseits belegen Untersuchungen zur Tumorstimmulierung, dass die Injektion apoptotischer Zellen nicht in jedem Fall zu Toleranz, sondern im Gegenteil auch zu einer aktiven Immunantwort gegen die Tumorzellen führen kann (Scheffer et al. 2003; Masse et al. 2004). Zudem treten einige der als Gefahrensignale beschriebenen, endogenen Moleküle wie Harnsäure oder Hitzeschock-Proteine auch unter apoptotischen Bedingungen auf und können in einer späten Phase der Apoptose freigesetzt werden (Shi et al. 2003; Srivastava 2002). Ebenso kann die zunehmende Oxidation von Membranlipiden im Verlauf der Apoptose pro-inflammatorische Konsequenzen haben (Chang et al. 2004). Die bivalente Natur der apoptotischen Zellen hinsichtlich ihrer Wirkungen auf das Immunsystem wird auch deutlich, wenn die Assoziation von Autoimmunkrankheiten mit Defekten bei der Aufnahme apoptotischer Zellen in Betracht gezogen wird (Sheriff et al. 2004; Casciola-Rosen et al. 1994). So ist bei Mäusen mit einer genetischen Defizienz der Brückenmoleküle C1q, MFG-E8, der sekretierten Form von IgM-Antikörpern beziehungsweise des Rezeptors Mer-Tyrosinkinase, einerseits die Aufnahme apoptotischer Zellen vermindert, andererseits entwickeln diese Mäuse – abhängig von der genetischen Prädisposition des jeweiligen Inzucht-Stammes – Symptome einer Autoimmunkrankheit, die dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) ähneln (Botto et al. 1998; Hanayama et al. 2004; Boes et al. 2000; Cohen et al. 2002). Beim Menschen sind Komplementdefekte ebenfalls eng mit dem Auftreten von SLE assoziiert (Taylor et al. 2000). Vermutlich führt in diesen Fällen die fehlende Beseitigung der Autoantigene in beziehungsweise auf den apoptotischen Zellen zur Bildung von Autoantikörpern und dem Auftreten der Krankheit (Rosen & Casciola-Rosen 1999). Demgegenüber zeigen Mäuse mit einer Defizienz für das Brückenmolekül MBL beziehungsweise für den Rezeptor CD14 zwar eine

verminderte Aufnahme apoptotischer Zellen, weisen aber keine stärkere Neigung zu Autoimmunkrankheiten auf (Devitt et al. 2004; Stuart et al. 2005).

Somit ist die Wirkung apoptotischer Zellen auf das Immunsystem nicht eindeutig. Vielmehr existiert während der Apoptose eine Balance zwischen anti- und pro-inflammatorischen Signalen, die von der Auslösung und dem Verlauf der Apoptose, der Art der sterbenden Zelle wie auch des lokalen Milieus während der Aufnahme abhängt (Pietra et al. 2001; Bratton & Henson 2005; Fadok et al. 1992a; Pradhan et al. 1997; Fujii et al. 2001; Wiegand et al. 2001)

### 3. Die Proteine der Annexin-Familie

#### 3.1 Struktur und Funktion der Annexine

Die Annexine bilden eine große, evolutionär konservierte Familie kalzium- und lipidbindender Proteine, die in Wirbeltieren, Pflanzen, Pilzen und Protisten, aber nicht in den bisher untersuchten Hefen und Bakterien vorkommen (Morgan & Fernandez 1995). Strukturelles Kennzeichen der Annexine ist eine Wiederholung von ca. 80 Aminosäuren, die sich in einer Domäne aus fünf  $\alpha$ -Helices anordnen (Annexin-Repeat). Innerhalb der Annexin-Repeats befindet sich weiterhin eine hochkonservierte Sequenz aus 17 Aminosäuren, die Endonexin-Faltung. Mit der Ausnahme von Annexin VI<sup>i</sup> bilden jeweils vier (Annexin VI: acht) der Annexin-Repeats die C-terminale Kern-Domäne, welche die kalziumabhängige Bindung der Annexine an negativ geladene Membranlipide vermittelt (siehe Abb. I.3 und Tab. I.1) (Huber et al. 1990; Huber et al. 1992). An die Kern-Domäne schließt sich ein für jedes Annexin einzigartiger N-Terminus an, der für die spezifischen Funktionen der verschiedenen Annexine verantwortlich gemacht wird. Während die Kern-Domäne innerhalb der Annexin-Familie konserviert ist, variieren die verschiedenen N-Termini stark in ihrer Länge und Aminosäuresequenz (Swairjo & Seaton 1994). Sie umfassen zwölf (Annexin IV) bis weit über hundert Aminosäuren (Annexin VII, XI) und enthalten zum Teil Motive für Phosphorylierungen, für Bindung von Liganden und

---

<sup>i</sup> Anmerkung: In der Nomenklatur werden die Annexine in fünf Gruppen eingeteilt (A-E) (Gerke & Moss 2002). Da sich im Folgenden auf die humanen Annexine bezogen wird (Gruppe A), wurde der Buchstabe "A" vor der Nummer des entsprechenden Annexins ausgelassen.

proteolytische Spaltung [Übersicht bei Raynal et al. 1993]. Annexine binden kalziumabhängig und reversibel an negativ geladene Membranlipide wie Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure, wobei die verschiedenen Mitglieder der Familie unterschiedliche Affinitäten für Kalziumionen und Membranlipide aufweisen, die zusätzlich durch pH-Veränderungen, Ligandenbindung und Phosphorylierung des N-Terminus beeinflusst werden (Gerke et al. 2005).

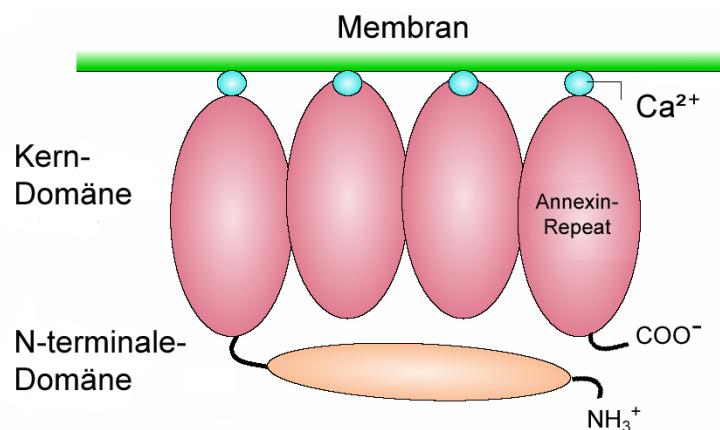


Abb I.3: Struktur eines membrangebundenen Annexins. (verändert nach Gerke et al. 2005)

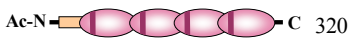
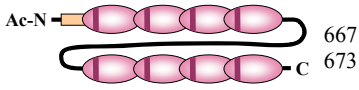

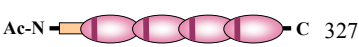
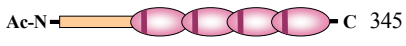
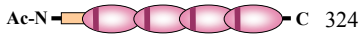
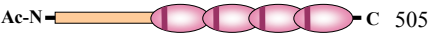

Annexine konnten in allen bisher untersuchten humanen Geweben nachgewiesen werden. Allerdings unterscheiden sich Anzahl und Menge der jeweils exprimierten Annexin-Familienmitglieder erheblich, so dass das Annexin-Profil jeder Zelle einen Zelltyp-charakteristischen "Annexin-Fingerabdruck" ergibt (Gerke & Moss 2002).

Die Annexine werden meist als ubiquitäre, zytosolische Proteine beschrieben, die Funktionen in zahlreichen zellulären Prozessen ausüben. Als membranbindende Proteine wird ihnen vor allem eine Rolle bei der Organisation von Membranstrukturen, bei der Aggregation von Membranen und bei Prozessen des Vesikeltransports zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Annexin II Interaktionen zwischen Membran und Zytoskelett vermittelt und die Ausbildung von Lipid-Mikrodomänen (*rafts*) unterstützt (Babiyhuk & Draeger 2000; Merrifield et al. 2001). Für mehrere Annexine (I, II, IV, VI und VII) konnte Membranaggregation durch gleichzeitige Bindung an zwei Membranen nachgewiesen werden – eine Funktion, die bei bestimmten Formen der kalziuminduzierten Exozytose und möglicherweise auch *in vivo* beim Befruchtungsvorgang des Fadenwurms *C. elegans* eine Rolle spielt (Creutz et al. 1996). Zudem konnten mehrere Annexine (I, II, VI) in der Zelle an

endosomalen Strukturen nachgewiesen werden, wo sie das Abschnüren und den Transport von Endosomen unterstützen (Seemann et al. 1996; Mayran et al. 2003; Ortega et al. 1998).

Insbesondere Annexin I, II und V wurden auch extrazellulär nachgewiesen, wobei der Mechanismus der Annexin-Sekretion noch unklar ist. Da die Proteine keine sekretorischen Signalsequenzen aufweisen und die Sekretion der Annexine nicht mit Inhibitoren des klassischen Sekretionsweges blockiert werden kann, wird ein alternativer Mechanismus, möglicherweise unter Beteiligung eines ABC-Transporters, angenommen (Comera & Russo-Marie 1995; Philip et al. 1998; Danielsen et al. 2003; Chapman et al. 2003). Die extrazellulären Funktionen der Annexine unterscheiden sich fundamental von ihren intrazellulären Funktionen. So wird für Annexin I eine Rolle im Immunsystem beschrieben (siehe unten), während Annexin II als Korezeptor für Plasminogen bei der Regulation der Fibrinolyse beteiligt ist (Ling et al. 2004) und Annexin V in der Plazenta möglicherweise anti-koagulierend wirkt (Rand 2000).

Annexin	Struktur	Expression	Referenzen
I		Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Neuronen, T-Zellen, Epithelien (obere Schichten), Kolonozyten, Hassal-Körperchen, Hypophyse	(Dreier et al. 1998) (Traverso et al. 1999) (Massey-Harroche et al. 1998)
II		Enterozyten, Gliazellen, Hepatozyten, Kolonozyten, Pankreas, vaskuläres Endothel, Hassal-Körperchen, Nervenfasern, Zilien der Atemwege	(Dreier et al. 1998) (Naciff et al. 1996) (Massey-Harroche et al. 1998)
III		Granulozyten, Monozyten, Astrozyten, sensorische Neuronen, vaskuläres Endothel	(Naciff et al. 1996) (Le, V et al. 1992)
IV		Hepatozyten, Hassal-Körperchen, Pankreas, Verdauungstrakt, Epithelien (Basalzellen), Zilien der Atemwege	(Dreier et al. 1998)

Annexin	Struktur	Expression	Referenzen
V	 320	Chondrozyten, Gliazellen, Myozyten, Plazenta	(Kirsch et al. 2000) (Kaetzel et al. 1989) (Spreca et al. 1992)
VI	 667 673	reife Lymphozyten, Hepatozyten, Leydig-Zellen, Myozyten, Plazenta, Pankreas (Inselzellen), sekretorische Epithelien,	(Clark et al. 1991) (Doubell et al. 1993)
VII	 466 488	Erythrozyten, Myozyten, Neuronen, Endothel, Nebenniere	(Salzer et al. 2002) (Selbert et al. 1995) (Creutz et al. 1978)
VIII	 327	Endothel (Lunge)	(Reutelingsperger et al. 1994)
IX	 345	Keratinozyten	(Nguyen et al. 2000) (Morgan & Fernandez 1998)
X	 324	Hepatozyten	(Liu et al. 2002b)
XI	 505	Myozyten, Fibroblasten, Hepatozyten,	(Mizutani et al. 1993) (Furge et al. 1999)
XIII	 316 357	Enterozyten	(Massey-Harroche et al. 1998)

**Tab. I.1: Übersicht der Vertebraten-Annexine.** Die Struktur der Proteine ist schematisch dargestellt und zeigt die Annexin-Repeats der N-Termini in rot sowie die hochkonservierten Endonexin-Faltung in dunkelrot. Die N-Termini der Proteine sind in braun abgebildet. Mit Ausnahme von Annexin XIII, das myristoyliert ist (Myr), sind die N-Termini acetyliert (Ac). Bekannte Stellen für Tyrosin- (Y) sowie Serin- und Threonin-Phosphorylierungen (S, T) sind eingezeichnet. Annexin I enthält zusätzlich ein Glutamin (Q), das von einer Transglutaminase quervernetzt werden kann. Die N-Termini von Annexin I und Annexin II enthalten eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, an die Proteine der S100-Familie binden können (gelb). Der N-Terminus von Annexin VII enthält eine Glycin-, Tyrosin- und Prolin-reiche Sequenz, die sich zu einer Pro- $\beta$ -Helix faltet (blau). Die Anzahl der Aminosäuren jedes Annexins ist hinter dem C-Terminus angegeben, dabei entsprechen mehrere Angaben verschiedenen Spleißvarianten der Proteine. Die Zellen und Gewebe mit einer hohen Expression der entsprechenden Annexine sind angegeben (verändert nach Gerke & Moss 1997 und Moss & Morgan 2004).

Trotz der zahlreichen Untersuchungen über die Rolle von Annexinen *in vitro* bleibt die physiologische Funktion der meisten Annexine *in vivo* weiterhin unklar. Mit Ausnahme von Annexin I-defizienten Mäusen, die verstärkte Entzündungsreaktionen aufweisen, ergeben auch die bisher untersuchten Mausmodelle mit Defizienzen für die Annexine V, VI, und VII keinen eindeutigen Hinweis auf die Rolle dieser Annexine *in vivo*, wobei die Analyse durch eine mögliche Redundanz der Funktionen innerhalb der Familie erschwert wird (Brachvogel et al. 2003; Hawkins et al. 1999; Herr et al. 2001).

### 3.2 Annexin I

Wie alle Annexine kann Annexin I strukturell und funktionell in den lipid- und kalziumbindenden C-terminalen Kern und den N-Terminus unterteilt werden. Der N-Terminus von Annexin I besteht aus 40 Aminosäuren und beinhaltet Motive für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C  $\delta$ , die EGF-Kinase und die HGF-Rezeptor-Kinase (Oudinet et al. 1993; Haigler et al. 1987; Skouteris & Schroder 1996). In Abwesenheit von Kalzium liegt der N-Terminus eng an der Kerndomäne an. Die Bindung von Kalzium induziert jedoch eine Konformationsänderung in Annexin I, so dass der N-Terminus dann von der Membran-abgewandten Seite des Moleküls absteht. Zudem ist der N-Terminus sehr sensitiv gegenüber Proteasen und kann vom Annexin-Kern abgespalten werden. Die Spaltung kann spontan, nach Stimulation mit Phorbolestern und im Verlauf der Apoptose erfolgen (Liu et al. 1995b; Debret et al. 2003), möglicherweise unter Beteiligung einer membranständigen Metalloprotease (Movitz & Dahlgren 2000). Bei der Spaltung entsteht neben dem N-Terminus ein 33 kD großes Kern-Fragment, das eine veränderte Lokalisation innerhalb der Zelle sowie veränderte Lipid- und Kalzium-Bindungseigenschaften aufweist. Die weitere funktionelle Bedeutung der Spaltung ist jedoch noch weitgehend unklar (Rosengarth & Luecke 2003; Movitz & Dahlgren 2000).

Die Expression von Annexin I ist gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert. Eine starke Expression findet sich in vielen Zellen des hämatopoetischen Systems, vor allem in neutrophilen Granulozyten, in denen Annexin I einen Anteil von bis zu vier Prozent des Gesamtproteingehaltes ausmacht, in Monozyten und Makrophagen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und T-Zellen. B-Zellen und Erythrozyten hingegen exprimieren kein oder sehr wenig Annexin I (Morand et al. 1995; Dreier et al. 1998).

Auch neuronale Zellen (Neuronen, Mikroglia und Purkinjezellen) und Epithelien weisen eine deutliche Annexin I-Expression auf. Andere Gewebe, zum Beispiel die Leber, zeigen keine basale Expression von Annexin I, allerdings kann das Protein dort im Verlauf der frühen Eymbyonalentwicklung und während der Leber-Regeneration nachgewiesen werden (Della et al. 2001; Masaki et al. 1994). Auch die Annexin I-Expression in monozytischen Zelllinien, Keratinozyten und Astrozyten kann durch Differenzierung mit Phorbolestern oder unter dem Einfluss von Zytokinen stimuliert werden (Kang et al. 1996; Sato-Matsumura et al. 2000; Miyachi et al. 2001). Somit scheint die Annexin I-Expression einer bestimmten Zelle dynamisch und fein reguliert zu sein, abhängig von der Art des Gewebes, dem Entwicklungs- und Differenzierungsgrad sowie dem zellulären Milieu aus Wachstums- und Stressfaktoren (de Coupade et al. 2000; Rhee et al. 2000).

Neben den Annexin-typischen intrazellulären Funktionen wie Membranaggregation, Endo- und Exozytose sind für Annexin I vor allem Funktionen bei der Regulation des Immunsystems nachgewiesen. Dabei wird Annexin I eine anti-inflammatorische Wirkung auf mehreren Ebenen zugeschrieben. Schon früh wurde das Protein als Vermittler der Wirkung von Glucocorticoiden beschrieben, insbesondere bei der Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> und damit der Produktion von Eicosanoiden (Wallner et al. 1986). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Inhibition jedoch um eine unspezifische Maskierung des Phospholipase-Substrates durch Bindung der Annexine an Phospholipide, und nicht um eine enzyspezifische Regulation der Phospholipase (Bastian et al. 1993; Raynal et al. 1993). Deutlichere Hinweise auf eine anti-inflammatorische Rolle von Annexin I ergeben sich *in vivo* aus dem Phänotyp von Annexin I-defizienten Mäusen, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber inflammatorischen Stimuli zeigen. Zusätzlich ist bei diesen Mäusen die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden vermindert (Hannon et al. 2003).

Eine immunsuppressive Funktion des Proteins ergibt sich auch aus Versuchen mit extrazellulärem Annexin I. Die Externalisierung beziehungsweise Sekretion des Proteins wurde nach einer Reihe verschiedener Stimuli beobachtet, zum Beispiel *in vitro* nach Behandlung von Zelllinien mit Glucocorticoiden und Zytokinen wie auch *in vivo* nach Adhäsion von Neutrophilen an kapillares Endothel (Solito et al. 1994; Castro-Caldas et al. 2002; Miyachi et al. 2001; Solito et al. 1998). Auch nach Induktion von Apoptose konnte externalisiertes Annexin I auf der Membran apoptotischer T-Zellen nachgewiesen werden (Arur et al. 2003). Allerdings ist der

zugrunde liegende Mechanismus für die Externalisierung oder Sekretion von Annexin I bisher unbekannt (siehe Seite 22).

In mehreren Entzündungsmodellen kann die Wirkung von Glucocorticoiden durch Injektion von Antikörpern gegen Annexin I aufgehoben werden (Perretti & Flower 1993; Duncan et al. 1993). Umgekehrt können verschiedene Entzündungsreaktionen *in vivo* durch direkte Injektion von Annexin I oder kürzeren Annexin I-Peptiden reduziert werden (Yang et al. 1997; Cirino et al. 1993; Perretti et al. 1993). Vor allem die ersten 26 Aminosäuren des N-Terminus und ein Antiflammin-2 genanntes Peptid aus acht Aminosäuren des Kern-Fragmentes sind als pharmakologisch wirksame Peptide untersucht worden (Yang et al. 1997; Moreno 2000).

Im Einklang mit dem Nachweis protease-sensitiver Annexin I-Bindungsstellen auf der Oberfläche von Monozyten und Neutrophilen (Euzger et al. 1999) konnte ein inhibierender Effekt auf die Extravasation von Neutrophilen und Monozyten in entzündetes Gewebe nachgewiesen werden (Getting et al. 1997), der durch die Rezeptoren der Formyl-Peptid-Rezeptor-Familie vermittelt wird (Walther et al. 2000; Ernst et al. 2004). *In vitro* beeinflusst Annexin I jedoch ebenfalls die Sekretion von Zytokinen und pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren. Bei primären humanen Monozyten konnte ein N-terminales Peptid aus den ersten 188 Aminosäuren von Annexin I die Sekretion von TNF- $\alpha$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> nach Stimulation mit Interleukin-1 hemmen. Außerdem wurde beschrieben, dass Annexin I beziehungsweise ein N-terminales Peptid der ersten 26 Aminosäuren bei einer murinen Makrophagen-Zelllinie die LPS-induzierte Sekretion von Stickstoff-Monoxid und die mRNA-Synthese des Zytokins Interleukin-12 inhibieren konnte (Sudlow et al. 1996; Ferlazzo et al. 2003). Die immunsuppressive Funktion von extrazellulärem Annexin I erstreckt sich daher möglicherweise auch auf die Ebene der Aktivierung von Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen.



### 4. Aufgabenstellung

Die immunologisch unauffällige Aufnahme von apoptotischen Zellen während der Entwicklung und Gewebehomöostase ist von herausragender Bedeutung für die Vermeidung von Autoimmunkrankheiten (Steinman & Nussenzweig 2002). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten immunsuppressive Effekte von apoptotischen Zellen nachgewiesen werden (Stuart et al. 2002; Ferguson et al. 2002; Steinman et al. 2000; Hugues et al. 2002). Daher müssen apoptotische Zellen über Signale verfügen, die nicht nur zur Aufnahme der Zellen führen, sondern aktiv die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verhindern und damit zur peripheren Toleranzinduktion beitragen (Steinman & Nussenzweig 2002). Trotz der Identifizierung einer Reihe von Liganden und Rezeptoren für die Aufnahme apoptotischer Zellen (Lauber et al. 2004) sind die molekularen Ursachen für die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte weitgehend unklar – insbesondere, da die Mehrheit der beschriebenen Moleküle auch in entzündlichen Prozessen die Aufnahme bakterieller Partikel vermittelt und somit offenbar keine intrinsische anti-inflammatorische Wirkung besitzt. Mit Ausnahme der Exposition von Phosphatidylserin (Huynh et al. 2002) wurden bisher keine anti-inflammatorischen Moleküle auf der Oberfläche apoptotischer Zellen beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, spezifische Oberflächenmoleküle apoptotischer Zellen zu charakterisieren und im Hinblick auf ihre Funktion bei der Interaktion apoptotischer Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen zu untersuchen. Dabei sollte neben einer möglichen Rolle bei der Phagozytose apoptotischer Zellen vor allem der inhibitorische Effekt apoptotischer Zellen auf die Immunantwort untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit apoptotischen Zellen immunisiert und monoklonale Antikörper erzeugt, um mit deren Hilfe apoptose-spezifische Oberflächenmoleküle zu identifizieren und weiterhin zu charakterisieren. Da inhibitorische Effekte vor allem früh-apoptotischen Zellen zugesprochen werden (Pietra et al. 2001), sollten bevorzugt Signale untersucht werden, die früh im Verlauf der Apoptose erscheinen. In Experimenten zur Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen sollten die identifizierten Moleküle dann mit Hilfe der Antikörper blockiert werden, um Hinweise auf eine Beteiligung dieser Moleküle bei der Inhibition dendritischer Zellen und darüber hinaus bei der Induktion von T-Zell-Toleranz durch die inhibierten dendritischen Zellen zu erhalten. In diesen Experimenten sollte neben

einer Analyse des Phänotyps der dendritischen Zellen im Hinblick auf Zytokinsekretion und Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle auch die Fähigkeit der dendritischen Zellen zur T-Zell-Stimulation beziehungsweise T-Zell-Suppression im Vordergrund stehen. Die gewonnenen Daten könnten Aufschluss über die molekularen Ursachen der Toleranzinduktion durch apoptotische Zellen geben und Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Entwicklung peripherer Toleranz im Rahmen von Tumortherapien beziehungsweise der Transplantationsmedizin aufzeigen.

Die Detektion apoptotischer Zellen *in vivo* ist bisher nur limitiert möglich. Daher sollten die gewonnenen Antikörper weiterhin auf ihre Bindung an apoptotische Zellen *in vivo* untersucht werden. Auf diese Weise sollten die Möglichkeiten der nicht-invasiven Darstellung apoptotischer Zellen *in vivo* erweitert werden, um den Verlauf verschiedener Tumor-Therapien besser verfolgen zu können.

## II. Material & Methoden:

### 1. *Material*

#### 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.

#### 1.2 Häufig verwendete Puffer

Annexin-Bindungspuffer:	10 mM	HEPES	
	140 mM	NaCl	
	2.5 mM	CaCl <sub>2</sub>	pH 7.4
Elutionspuffer: (Antikörper-Aufreinigung)	0.1 M	Glycin-HCl	pH 3
Waschpuffer: (Antikörper-Aufreinigung)	0.1 M	Tris-HCl	pH 8
ELISA-Coatingpuffer:	100 mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	pH 9.6
ELISA-Waschpuffer:		PBS	
	0.05 % (v/v)	Tween 20	
FACS-Puffer:		PBS	
	10 % (v/v)	FBS	
Sensitivierungslösung: (Silberfärbung)	0.3 % (w/v)	Kaliumtetrathionat	
	500 mM	Kaliumacetat	

## Material & Methoden

	30 % (v/v)	Ethanol
Entwickler:		PBS
(Silberfärbung)	10 % (v/v)	FBS
Stopp-Lösung:	300 mM	TRIS
(Silberfärbung)	5 % (v/v)	Eisessig
Lysepuffer:	150 mM	NaCl
	30 mM	Tris-HCl     pH 7.5
	1 mM	PMSF
	10 % (w/v)	Glycerol
	1 % (w/v)	Triton X-100
	0.5 µg/ml	Antipain
	0.5 µg/ml	Chymostatin A
	0.5 µg/ml	Leupeptin
	0.5 µg/ml	Pepstatin
MACS-Puffer:		PBS
	0.5 % (w/v)	BSA
	2 mM	EDTA
Nicolettipuffer:	0.1 % (w/v)	Natriumcitrat
	0.1 % (w/v)	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
OPD-Substratlösung:	1 mg/ml	o-Phenylendiamin
in Citratpuffer:	0.03 M	Zitronensäure
	0.07 M	Na-Citrat     pH 5.0
	0.012 % v/v	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PBS:	137 mM	NaCl
	8.1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2.7 mM	KCl
	1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4

Pepsinpuffer:	20 mM	Natrium- acetat	pH 4.5
Probenpuffer reduz. (5x): (SDS-PAGE)	50 % (v/v) 10 % (w/v) 50 mM 25 % (v/v) 0.25 mg/ml	Glycerol SDS Tris $\beta$ -Mercaptoethanol Bromphenolblau	pH 6.8
Laufpuffer: (SDS-PAGE)	25 mM 0.19 M 1 % (w/v)	Tris-Base Glycin SDS	
Sammelgel (5 %): (SDS-PAGE)	24 mM 5 % (w/v) 0.1 % (w/v) 0.1 % (w/v) 0.1 % (w/v)	Tris-HCl Acrylamid SDS APS TEMED	pH 6.8
Trenngel: (SDS-PAGE)	37.5 mM 10-12 % (w/v) 0.1 % (w/v) 0.03 % (w/v) 0.1 % (w/v)	Tris-HCl Acrylamid SDS APS TEMED	pH 8.8
Transferpuffer: (Western Blot)	25 mM 0.19 M 20 % (v/v) 0.037 % (w/v)	Tris Glycin Methanol SDS	
Wasch-Puffer: (Westernblot)	0.1 % (w/v)	PBS Tween-20	

### 1.3 Biologisches Material

#### 1.3.1 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Herkunft	Referenz
Jurkat	Humanes T-Zell-Lymphom	(Schneider et al. 1977)
CCRF-CEM	Humanes T-Zell-Lymphom	(Foley et al. 1965)
Raji	Humanes Burkitt-Lymphom	(Pulvertaft 1964)
U-937	Humanes Histiozytom	(Sundstrom & Nilsson 1976)
X63AG8.653	Murines Myelom	(Kearney et al. 1979)
HeLa	Humanes Cervixkarzinom	(Scherer et al. 1953)
A-375	Humanes Melanom	(Giard et al. 1973)
SKW6.4	Humane B-Lymphoblastoide Zelllinie	(Ralph et al. 1983)

### 1.4 Nährmedien

Pulverisiertes Zellkulturmedium RPMI 1640 wurde von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben in pyrogenfreiem Wasser gelöst. Die Medien wurden sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen supplementiert:

10 % (v/v)	FBS (Gibco BRL, Karlsruhe)
10 mM	HEPES (Gibco BRL, Karlsruhe)
1 % (v/v)	Glutamax (Gibco BRL, Karlsruhe)

Gebrauchsfertiges RPMI 1640-Medium für die Kultur primärer dendritischer Zellen wurde ebenfalls von Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen.

## 1.6 Antikörper

<b>Name</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft, Referenz</b>
anti-APO-1 Maus (IgG3)	CD95	(Trauth et al. 1989)
DAC5 Maus (IgG2a)	Annexin I	
anti-Annexin I Maus (IgG1)	Annexin I	BD Transduction Labs., Heidelberg
anti-Annexin II Maus (IgG1)	Annexin II	BD Transduction Labs., Heidelberg
anti-Annexin IV Maus (IgG1)	Annexin IV	BD Transduction Labs., Heidelberg
anti-Caspase-3 Ziege (polyklonal)	Caspase-3	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD31, FITC Maus (IgG1)	CD31	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD40, PE-Cy5.5 Maus (IgG1)	CD40	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD80, PE Maus (IgG1)	CD80	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD83, FITC Maus (IgG1)	CD83	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD86, PE Maus (IgG2b)	CD86	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-HLA-DR, FITC Maus (IgG2b)	HLA-DR	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Erk Maus (IgG1)	Erk 1	R&D Systems, Wiesbaden
anti Maus IgG-FITC Ziege (polyklonal)	Maus IgG	Jackson Research, Westgrove, USA
anti Maus IgG, FITC ( $\gamma$ -Ketten spezifisch) Ziege (polyklonal)	Maus IgG, $\gamma$ -Ketten	Southern Biotechnology, Birmingham, USA

## 1.7 Zytokine

Humanes rekombinantes GM-CSF (Leukine<sup>®</sup>) wurde von der Firma Schering (Berlin) bezogen. Alle übrigen Zytokine wurden von der Firma Immunotools (Friesoythe) bezogen. Nach Erhalt wurden die Zytokine in sterilem, LPS-freiem PBS mit 0.1 % (w/v) BSA (Sigma, München) gelöst und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

## 1.7 Geräte und Material

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Annexin V, Alexa 594	Molecular Probes, Carlsbad, USA
Annexin V, FITC	Caltag, Hamburg
Autoradiographie-Filme (Hyperfilm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Autoradiographie-Hüllen	Rego, Augsburg
Durchflusszytometer	FACScan II, Becton Dickinson, San Jose, USA
ELISA-Reader	Victor, Wallac, Gaithersburg, USA
Entwicklungsmaschine	Classic E.O.S., Agfa, Köln
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific (Thermo), Dreieich
Geltrockner	Modell 583, Biorad, München
Harvester	Tomtec, Hamdon, USA
Inkubator für die Zellkultur	Steri-Cult, Forma Scientific (Thermo), Dreieich
Kühlzentrifuge	Megafuge 3.0 RS, Heraeus (Thermo), Dreieich
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Jena
Schüttler	Unimax 2010, Heidolph, Kehlheim
SDS-PAGE & Westernblot-Apparatur	Mini Protean II, BioRad, München



Gerät	Hersteller
sterile Werkbank	SteriGARD Hood, Baker, Sanford, USA
Szintillations-Zähler/ Proliferationsexperimente	1205 Betaplate Reader, Wallac, Gaithersburg, USA
Szintillations-Zähler/ Maus-Gewebe	TriCarb 2100 TR, Packard, Ramsey, USA
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus (Thermo), Dreieich
UV-Strahler	Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, USA
Zählkammer n. Neubauer	HBG, Lützellinden

## 2. Methoden

### 2.1 Proteinchemische Methoden

#### 2.1.1 Aufreinigung von rekombinantem Annexin I

Das rekombinante Annexin I wurde von Isabel Vogler im Rahmen ihrer Masterarbeit hergestellt (Vogler, Isabel: „Influence of Annexin 1 and its Domains on Cellular Immune Responses“, eingereicht bei der Fachhochschule Mannheim, Fakultät für Biotechnologie) und freundlicherweise für Versuche zur Verfügung gestellt. Für die Aufreinigung wurde die DNA-Sequenz für Annexin I zunächst um die Sequenz für einen Abschnitt aus bakteriellem Protein A ergänzt. Das veränderte Annexin I wurde in BL21(DE3)pLysS pTK1 *E. coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) mit Hilfe des bakteriellen Expressionsvektors pET-41a(+) (Novagen, Madison, USA) exprimiert und aus den bakteriellen Lysaten mittels IgG-Sepharose (Sigma, München) isoliert. Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Gelfiltration mit einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 Säule und Dialyse gegen PBS. Das Protein wurde anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in diskontinuierlichen SDS-PA-Gelen (Laemmli 1970) mit einem 10-12 % Acrylamid-Trenngel und 5 % Acrylamid-Sammelgel aufgetrennt. Für das Giessen und den Lauf der Gele wurde das Mini Protean II-System verwendet (BioRad, München). Die Gele hatten folgende Dimensionen:

Sammelgel: 80 mm x 15 mm x 0,75-1,5 mm

Trenngel: 80 mm x 55 mm x 0,75-1,5 mm.

Die Gelzusammensetzung ist in Abschnitt II.1.2 aufgeführt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min bei 20 °C wurde der Alkohol durch Spülen mit Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation (10 min) wurden die Gele beladen. Proteinlösungen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Der Lauf der Gele erfolgte bei 80 bis 130 Volt für 1-2 h.

Für die in Abb. III.2 gezeigte Silberfärbung und den Westernblot aus Abb. III.3 wurden größere Gele mit folgenden Abmessungen verwendet:

Sammelgel: 145 mm x 30 mm x 1,5 mm

Trenngel: 145 mm x 150 mm x 1,5 mm

Die Gele wurden mit einem 10 % Acrylamid-Trenngel nach dem oben beschriebenen Verfahren gegossen und beladen. Der Lauf erfolgte bei 40-80 Volt für 12-20 h.

### 2.1.3 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Um Größe, Reinheit und Menge von Proteinen zu bestimmen, können diese nach Auftrennung in einer SDS-PAGE direkt angefärbt werden. Die Silberfärbung nutzt die Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber. Die Proteine im Gel katalysieren diese Reaktion, so daß an den entsprechenden Stellen die Reduktion wesentlich schneller erfolgt. Durch das reduzierte Silber wird ein Abbild der Proteinverteilung im Gel hergestellt (Merril & Pratt 1986). Für die Silberfärbung wurden die Gele zunächst mit einem Gemisch aus 30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure für mindestens 2 h fixiert. Nach 45 min Inkubation in Sensitivierungs-Lösung wurden die Gele sechsmal in *aqua dest.* gewaschen und mit einer Lösung aus 0.2 % (w/v) Silbernitrat imprägniert. Nach kurzem Waschen in *aqua dest.* für 15 s wurden die Gele in Entwickler bis zu einer kontrastreichen Färbung inkubiert (ca. 30-40 min). Die Reaktion wurde mit Tris-Eisessig (300 mM Tris, 5 % (v/v) Eisessig) abgestoppt. Nach erneutem Waschen wurden die Gele eingescannt und getrocknet.

### 2.1.4 Westernblot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamid-Gelen auf Membranen wurde ein "Nass"-Verfahren eingesetzt. Dazu wurden zwei Whatmann-Filterpapiere, Hybond-ECL-Membran C (Amersham-Buchler, Braunschweig), Gel und wiederum zwei Filterpapiere in einer Blotkassette aufeinandergelegt und in die vollständig mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gesetzt. Der Transfer erfolgte bei 2,5 mA/cm<sup>2</sup> für mindestens 2,5 h bei 4 °C. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T 0.1 % bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Waschen in TBS-T 0.1 % wurde die Membran mit dem Primärantikörper für 16 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde dreimal je 10 min mit TBS-Tween 0.1 % gewaschen und die Membran mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20.000 in PBS-T 0.1 %) für 60 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde der Blot mit der ECL-Reaktion (Amersham-Buchler) entwickelt und auf Autoradiographie-Filmen exponiert.

### 2.1.5 ELISA

Der ELISA (englisch: *enzyme-linked immunosorbent assay*) dient der Detektion von Proteinen in Lösung, in diesem Fall der Bestimmung der Konzentration von Zytokinen im Zellkultur-Überstand. Zur Bestimmung der Konzentration von TNF- $\alpha$  und Interleukin-10 wurden OptiEIA-Kits (Pharmingen, Heidelberg) verwendet, die nach dem Sandwich-ELISA-System aufgebaut sind. Protein-Standards und Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Das Volumen der Proben und der Verdünnungen des Standards betrug abweichend von den Herstellerangaben 50  $\mu$ l pro Loch, da 96-Loch-Platten mit der Hälfte der Standard-Fläche eingesetzt wurden („96 well Half Area flat bottom“, Corning B.V., Schiphol-Rijk). Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Capture-Antikörper verdünnt in Coating-Puffer inkubiert, anschließend 3 x mit ELISA-Wasch-Puffer gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h bei 20 °C mit PBS/10% FBS inkubiert. Anschließend wurden die Platten wiederum 3 x gewaschen und für 2 h bei 20 °C mit dem Zellkultur-Überstand inkubiert. Darauf wurden die Platten 5 x gewaschen und für 1 h bei 20 °C mit dem Detection-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase (*enzyme reagent*) inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen wurden die Platten schließlich für 10-20 min mit OPD-Substratlösung entwickelt. Nach deutlicher Farbreaktion des Standards wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 Vol. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und im ELISA-Reader (Wallac, Gaithersburg, USA) bei 490 nm analysiert.

### 2.1.6 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden aus Zellkultur-Überständen von Hybridomkulturen aufgereinigt. Die Überstände wurden über eine Protein A-Sepharose-Säule (Sigma) gegeben und anschließend mit 500-2000 ml 0.1 M Tris-HCl, pH 8 gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 0.1 M Glycin-HCl, pH 3 in mehreren Fraktionen. In den Fraktionen wurde der Proteingehalt mit der BCA-Methode (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt und die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt vereinigt. Die Antikörper wurden gegen steriles, LPS-getestetes PBS dialysiert (MWCO 100.000; Spectrapor, Roth, Karlsruhe) und anschließend sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Protein- und LPS-Konzentration wurde die Antikörperpräparation bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.1.7 Herstellung eines F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes

Ein Antikörpermolekül ist strukturell und funktionell in ein divalentes antigenbindendes Fragment F(ab')<sub>2</sub> und ein rezeptorbindendes Fragment (F<sub>c</sub>) unterteilt. Der F<sub>c</sub>-Teil eines Antikörpers vermittelt dessen sekundäre Funktionen wie die Bindung an Fc-Rezeptoren oder die Aktivierung der Komplementkaskade. Um diese Funktionen bei experimentellen Analysen auszuschließen, kann das rein antigenbindende Fragment verwendet werden, indem der F<sub>c</sub>-Teil des Antikörpers proteolytisch abgespalten wird. Hierzu wurden 20 – 50 mg des aufgereinigten monoklonalen Antikörpers gegen sterilen Pepsinpuffer dialysiert. Anschließend wurden 500 µl Pepsin-Agarose (Pierce) mit sterilem Pepsinpuffer äquilibriert und mit dem Antikörper für 8 h bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Die Pepsin-Agarose wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der abgespaltenen F<sub>c</sub>-Fragmente über eine Protein A-Sepharose-Säule (Sigma) gegeben. Anschließend wurde das gereinigte F(ab')<sub>2</sub>-Fragment gegen steriles, LPS-getestetes PBS dialysiert (MWCO 50.000; Spectrapor, Roth) und anschließend sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Protein-Konzentration und der LPS-Konzentration wurden die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.1.8 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden zytosolische Extrakte eingesetzt (siehe 2.2.17). Die Extrakte wurden mit Lysepuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und mit je 30-50 µl Protein A-Sepharose (Sigma) sowie 10-20 µg aufgereinigtem Antikörper versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte für mindestens 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose bei 1000 x g pelletiert und 3-6 x mit je 1 ml PBS gewaschen. Gebundene Proteine wurden von der Sepharose durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer eluiert und direkt in einer SDS-PAGE eingesetzt.

### 2.1.9 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte mit der BCA-Methode (Pierce) in 96-Loch-Platten nach den Herstellerangaben. 200 µl der BCA-Färbelösung wurden mit 20 µl der Proteinlösungen bzw. eines BSA-Standards versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Färbung der Lösung wurde durch Absorption bei 560 nm im ELISA-Reader (Wallac) bestimmt.

### 2.1.10 Bestimmung der LPS-Konzentration in Lösung

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und aktiviert durch Stimulation des Toll Like Rezeptors 4 dendritische Zellen und Makrophagen. Um Effekte durch Verunreinigungen in den verwendeten Puffern und Antikörper- bzw. F(ab')<sub>2</sub>-Präparationen auszuschließen, wurde der LPS-Gehalt mit Hilfe des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Tests bestimmt (BioWhittaker, Walkersville, USA). Der Test beruht auf einem Pro-Enzym in den Amöbozyten der Krabbe *Limulus polyphemus*, das durch LPS aktiviert wird. Die Aktivität des Enzymes entspricht der LPS-Konzentration und wird mit Hilfe eines Substrates kolorimetrisch bestimmt. Die Proben und Standards wurden nach Hersteller-Angaben angesetzt und der Farbumschlag durch Absorption bei 405 nm im ELISA-Reader (Wallac) gemessen.

### 2.1.11 Massenspektroskopische Analyse

#### **Tryptischer Verdau**

Die massenspektroskopische Analyse der Proteinbanden aus Abb. III.2 wurde von der Abteilung Zentrale Proteinanalytik des DKFZ unter der Leitung von Dr. M. Schnölzer durchgeführt. Die beiden DAC5-spezifischen Proteinbanden der apoptotischen und der unbehandelten Zellen wurden dafür zunächst aus dem Gel ausgeschnitten und wiederholt mit *aqua dest.* gewaschen. Anschließend wurden die Banden mit 40 mM Ammonium-Bicarbonat/Ethanol (1:1 v/v) gewaschen, mit Hilfe von 10 mM DTT bei 56 °C für 1 h reduziert und mit 55 mM Iodacetamid bei 25 °C für 30 min im Dunkeln alkyliert. Der Verdau mit Trypsin (10 ng/µl, Promega, Mannheim) erfolgte im Gel in 40 mM Ammonium-Bicarbonat bei 37 °C über Nacht.

### MALDI-TOF Massenspektroskopie

Nach dem tryptischen Verdau wurden Peptide im Überstand des Geles durch wiederholtes Pipettieren an ZipTip C18 (Millipore, Schwalbach) absorbiert. Anschließend wurden die Peptide mit 1 µl Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure gesättigt in 50 % Acetonitril/H<sub>2</sub>O) eluiert. MALDI-TOF-Spektren wurden im positiven Ionen-Reflektor-Modus mit verzögerter Extraktion in einem Reflex II *Time-Of-Flight* Spektroskop (Bruker-Daltonik, Bremen) aufgezeichnet. Folgende Einstellungen wurden für die Messung verwendet: Ionen-Beschleunigung: 26.5 kV; Reflektoreinstellung: 30.0 kV; erste *extraction plate*: 20.6 kV. Die Massenspektren wurden durch gemittelte Werte von 50-200 einzelnen Laserbestrahlungen erhalten und die Kalibrierung erfolgte intern mit Autolyse-Produkten von Trypsin. Die *Post-Source-Decay*-Analyse wurde im positiven Ionen-Reflektor-Modus bei verzögerter Extraktion und einem Ionen-Gate von 40 D um das zu untersuchende Ion durchgeführt. Die Daten wurden in 14 Segmenten bei schrittweiser Verringerung der Reflektor-Spannung ermittelt. Für jedes Segment wurden 100-200 einzelne Laser-Bestrahlungen gesammelt. Für das Fragment-Spektrum wurden alle Segmente mit Hilfe des FAST Computerprogramms (Bruker Daltonik) zusammengefügt. Die Kalibrierung für die Fragment-Ionen erfolgte extern mit Hilfe der Masse von Fragmenten des Adrenocorticotropen Hormons 18-39.

### Datenbank-Suche

Massen von einfach geladenen, monoisotopen Peptiden wurden als Grundlage für die Datenbanksuche herangezogen. Die NCBI-Datenbank wurde dafür mit dem ProFound Suchalgorithmus (<http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe>) durchsucht. Folgende Suchparameter wurden verwendet: Die isoelektrische Punkte der Kandidatenproteine konnten von 0 bis 14 variieren; Carbamido-Methylierung wurde als feste Modifizierung und die Oxidation als mögliche Modifizierung vorgegeben. Die Toleranzen der Suche betragen bis zu einem ausgelassenen tryptischen Verdau und +/- 100 ppm für die Massen der monoisotopen Peptide. Die Suche mit den Massen der Fragmente aus der *Post-Decay*-Analyse wurden wiederum mit Hilfe der NCBI-Datenbank unter Verwendung des *MS-Tag* Suchalgorithmus aus der Protein Prospector Software (<http://prospector.ucsf.edu>) mit folgenden Parametern durchgeführt: *parent*-Toleranz: +/- 0.1 D; Fragment-Ionen-Toleranz: +/- 0.9 D. Durch die Datenbank-Recherche konnten die Massen mehrerer

Peptide mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit humanem Annexin I zugeordnet werden (siehe Anhang V.2).

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryontischer Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien (Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen etc.) der Firmen Renner (Dannstadt), Falcon (Becton Dickinson, San Jose, USA), Greiner (Frickhausen) und Nunc (Wiesbaden) verwendet. Alle eukaryontischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 97 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % Zusatz von FBS und 1 % zugesetztem Glutamax (alle Materialien von Gibco BRL, Karlsruhe) ohne Antibiotika kultiviert. Für die Kultur der Hybridom-Zellen wurde diesem Medium 50 µM β-Mercapto-Ethanol (Sigma) zugefügt.

### 2.2.2 Präparation primärer humaner T-Zellen

Alle Waschschriffe wurden mit sterilem PBS oder RPMI 1640-Medium ohne FBS durchgeführt. 250-500 ml Vollblut wurden mit 1 ml Heparin (Braun, Melsungen) versetzt, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Jeweils 15 ml Biocoll-Lösung (Biochrom, Berlin) wurden mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (700 x g/20 min/20 °C/ohne Bremse). Die Leukozyten wurden abgenommen, zweimal gewaschen und in 200 ml RPMI 1640-Medium/10 % FBS aufgenommen. Anschließend wurden mononukleäre Zellen depletiert, indem die Zellen auf 2 große Zellkulturflaschen verteilt und mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert wurden. Die nicht-adhärenenten Lymphozyten wurden abgenommen und pelletiert (600 x g/10 min/20 °C). Zur Isolation der T-Zellen wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium/10 % FBS auf 8 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und im Verhältnis 1:2 mit 2 % AET-Erythrozyten (s.u.) gemischt (Rosettierung).

Das Gemisch wurde zentrifugiert (500 x g/10 min/20 °C/Bremse Stufe 2), der Überstand bis auf 20 ml abgenommen und das Pellet (Rosetten) vorsichtig wieder in RPMI 1640-Medium/10 % FBS resuspendiert. Die Rosetten wurden erneut auf 15 ml



Biocoll geschichtet und zentrifugiert (700 x g/20 min/20 °C/ohne Bremse). Das Pellet aus T-Zellen und Erythrozyten wurde gewaschen (600 x g/10 min/20 °C), und zur Lyse der Erythrozyten mit dem vierfachen Volumen (bezogen auf das Pellet) an ACK-Puffer (frisch verdünnt aus 10x Puffer: 41.45 g NH<sub>4</sub>Cl, 5 g KHCO<sub>3</sub>, 0.186 g EDTA, pH 7.27 ad 500 ml Wasser) versetzt. Pellet und ACK-Puffer wurden durch Pipettieren bis zur Lyse vermischt. Die Lyse der Erythrozyten zeigt sich durch einen Farbumschlag von trüb-hellrot nach klar-dunkelrot. Darauf wurde die T-Zell-Suspension mit RPMI 1640-Medium/10 % FBS auf 50 ml aufgefüllt und pelletiert (700 x g/20 min/20 °C/Bremse 9). Abschließend wurden die T-Zellen mit RPMI 1640-Medium/10 % FBS auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt.

Zur Stimulation wurden die T-Zellen mit 1 µg/ml PHA-P (Sigma) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen dreimal gewaschen, erneut auf 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und mit 25-30 U/ml Interleukin-2 für weitere 5 Tage in Kultur gehalten.

### **AET-Erythrozyten**

Alle Zentrifugationen wurden bei 470 x g für 10 min bei 20 °C durchgeführt. 0.5 g 2-Aminoethylisothiuroniumbromid (AET, Sigma) wurden in 12.5 ml pyrogenfreiem Wasser bei pH 9.0 (mit 2N NaOH einstellen) gelöst und sterilfiltriert. 25 ml eines 1:1 Gemisches aus Hammelblut und Alsever-Lösung (Gibco BRL) wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, zur AET-Lösung gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde viermal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich eine 2 %ige Suspension in RPMI 1640-Medium/10 % FBS hergestellt, die bis zu 3 Tagen haltbar war.

### 2.2.3 Präparation und Differenzierung primärer humaner dendritischer Zellen

Für die Isolierung und Kultivierung primärer humaner dendritischer Zellen wurde RPMI 1640-Medium mit 1 % Glutamax (Gibco BRL) ohne Antibiotika verwendet. Dem Medium wurde versuchsweise entweder 10 % FBS, oder 1 % humanes AB-Serum bzw. humanes 1 % Donor-Plasma zugesetzt. Die gezeigten Daten stammen aus Medium mit einem Zusatz von 10 % FBS (Gibco BRL) (Abb. III.9) beziehungsweise 1 % humanem AB-Serum (Sigma) (Abb. III.10).

### Präparation humaner Monozyten

Die Präparation von Monozyten erfolgte aus Vollblut nach Präparation von Leukozyten (siehe 2.2.2). Die weitere Isolierung der Monozyten erfolgte durch Plastik-Adhärenz bzw. Isolierung mit magnetischen anti-CD14-MicroBeads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach). Für die Plastikadhärenz wurden die Leukozyten in einem Volumen von 24 – 36 ml RPMI 1640-Medium/10 % FBS aufgenommen und in 2 ml pro Loch in zwei bis drei 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 1 h Inkubation im Inkubator wurden die adhärenenten, mononukleären Zellen mit warmem, sterilem PBS gewaschen.

Die Isolation mit anti-CD14-MicroBeads erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden die Leukozyten in 80 µl MACS-Puffer je  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde mit 10 µl anti-CD14-Beads je  $1 \times 10^7$  Zellen für 15 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Darauf wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer je  $1 \times 10^7$  Zellen gewaschen und für 10 min bei 300 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 500 µl MACS-Puffer je  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert und über eine LS-Säule (Miltenyi) in einem magnetischen Zellseparator (MidiMACS, Miltenyi) gegeben. Die isolierten Monozyten wurden 3 x mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen und in einem Volumen von 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die Monozyten wurden gezählt, pelletiert (10 min, 300 x g, RT) und jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen in 2 ml RPMI 1640-Medium/10 % FBS in 6-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert. Nach mind. 1 h im Inkubator wurden die adhärenenten Monozyten 1x vorsichtig mit warmem sterilen PBS gewaschen.

### Differenzierung

Die Differenzierung dendritischer Zellen erfolgte ausgehend von frisch isolierten Monozyten durch sechstägige Kultivierung in GM-CSF- und IL-4-haltigem Medium (Sallusto & Lanzavecchia 1994). Die adhärenenten mononukleären Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten mit 3 ml RPMI 1640-Medium pro Loch kultiviert. Dem Medium wurde noch 1 % Glutamax und 10 % FBS bzw. 1 % humanes AB-Serum oder 1 % Donor-Plasma sowie 1000 U/ml GM-CSF (Leukine®, Schering, Berlin) und 500 U/ml IL-4 (Immunotools, Friesoythe) zugesetzt. Nach drei Tagen wurden den Kulturen neue Zytokine zugesetzt. Dafür wurden zu den Zellkultur-Löchern jeweils 0.5 ml RPMI 1640-Medium mit dem entsprechenden Serum und 3500 U/ml GM-CSF sowie 1500 U/ml IL-4 zugegeben. Nach insgesamt sechs Tagen wurden die unreifen DCs vorsichtig mit dem Zellkultur-Überstand abgenommen, gezählt und  $1 \times 10^5$  Zellen pro Loch in 48-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt.

### 2.2.4 Präparation humaner neutrophiler Zellen

Primäre humane neutrophile Granulozyten wurden durch eine Dichte-Zentrifugation aus 20-30 ml heparinisiertem Vollblut isoliert. Dazu wurden jeweils 4 ml Polymorphprep (Axis Shield, Oslo, Norwegen) mit 5 ml Blut vorsichtig überschichtet und zentrifugiert ( $470 \times g/40 \text{ min}/20 \text{ °C}$ /ohne Bremse). Nach der Zentrifugation flotieren die mononukleären Lymphozyten auf dem Polymorphprep, während sich die polymorphkernigen Neutrophilen als Ring in der Interphase sammeln. Die Erythrozyten werden unter diesen Bedingungen pelletiert. Daher wurde der oberste Ring aus mononukleären Lymphozyten verworfen und die Neutrophilen des mittleren Ringes vereinigt. Zum Ausgleich der Osmolarität wurde den Zellen 1 x Volumen 0.45 % NaCl-Lösung zugegeben und erneut zentrifugiert ( $600 \times g/10 \text{ min}/20 \text{ °C}$ ). Verbliebene Erythrozyten wurden durch hypotone Lyse (1 min in 5 ml eiskalter 0.4 % NaCl-Lösung, anschließend Zugabe von 5 ml eiskalter 1.6 % NaCl-Lösung) entfernt. Die Neutrophilen wurden zu  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 6-Loch-Zellkulturplatten in RPMI 1640-Medium/10 % FBS kultiviert.

### 2.2.5 Immunisierungen

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen apoptotische Zellen wurden acht C57BL/6-Mäuse mit einer Zellsuspension aus apoptotischen Zellen in PBS intraperitoneal immunisiert. Die Immunisierung erfolgte 3-5 mal in einem Abstand von 2 bis 4 Wochen. Injiziert wurden jeweils  $5 \times 10^6$  apoptotische Jurkat T-Zellen in 500  $\mu\text{l}$  PBS. Die Jurkat T-Zellen wurden vor der Injektion mit 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin präinkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Staurosporin ist ein unpezifischer Kinase-Inhibitor, der den mitochondrialen Weg der Apoptose auslöst (Scarlett et al. 2000; Tamaoki et al. 1986). Um die Immunogenität der injizierten Zellen zu verstärken, wurde dem Bericht von Stach *et al.* entsprechend (Stach et al. 2000) bei den ersten beiden Injektionen jeweils 1.2  $\mu\text{g/ml}$  Annexin V zu den apoptotischen Zellen gegeben. Durch unterschiedliche Inkubationszeiten mit Staurosporin wurden Zellen in verschiedenen Stadien der Apoptose für die Immunisierungen erhalten. Die Inkubationszeiten mit Staurosporin betragen 0.5, 2, 4 und 8 Stunden. Jeweils zwei Mäuse wurden pro Inkubationszeit injiziert.

### 2.2.6 Fusion der primären Milzzellen und Ag8-Zelllinie

Zur Immortalisierung der Antikörper-produzierenden Plasmazellen wurden diese mit Mäuse-Myelomzellen der Maus-Myelom-Zelllinie X63AG8.653 (Ag8) fusioniert (Kohler & Milstein 1975). Dazu wurde den Mäusen die Milz entnommen, deren Zellen durch ein Sieb vereinzelt, in 15 ml RPMI/10 % FBS aufgenommen und pelletiert (460 x g, 5 min, RT). Das Zell-Pellet wurde 3x mit je 20 ml DPBS gewaschen. Darauf wurden die Milzzellen mit den Ag8-Zellen im Verhältnis 2.5:1 gemischt und wiederum pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für genau 1 min im Wasserbad bei 37 °C geschwenkt. Die Fusion erfolgte durch Zugabe von 1 ml vorgewärmten Polyethylenglycol (PEG 1500, Böhringer, Mannheim) über einen Zeitraum von 1 min bei 37 °C. Der Ansatz wurde noch exakt 1 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 ml warmes DPBS während 5 min zu den Zellen gegeben. Zu der Zellsuspension wurden darauf noch 40 ml RPMI 1640-Medium/10% FBS mit HAT-Zusatz (Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltiges Medium-Supplement, Gibco BRL) gegeben. Der Zusatz von HAT erlaubt ausschließlich das Wachstum fusionierter Hybridom-Zellen, da unfusionierte Ag8-Zellen sowie primäre Milz-Zellen absterben. Die Zell-Suspension wurde in 100 µl pro Loch in insgesamt fünfzehn 96-Loch-Zellkulturplatten für 3-4 Wochen im Inkubator kultiviert. Nach 1-2 Wochen wurde zu jedem Loch 100 µl frisches RPMI 1640-Medium mit HAT-Zusatz gegeben.

### 2.2.7 Testen der Hybridoma-Zell-Überstände

Bei sichtbarem Wachstum einzelner Klone in den Zellkulturplatten wurden jeweils 50 µl des Zellkultur-Überstandes abgenommen und im Durchflusszytometer auf Bindung der sekretierten Antikörper an apoptotische Zellen getestet. Dazu wurden Jurkat T-Zellen für 4 h mit 1 µM Staurosporin inkubiert, in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, pelletiert (1500 x g, 10 min, 4 °C) und jeweils 100.000 Zellen für 20 min mit den Überständen der Hybridom-Kulturen inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und für 20 min mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper (5 µg/ml,  $\gamma$ -Ketten spezifisch, Southern Biotech, Birmingham, USA) inkubiert. Nach erneutem Waschen konnten die Zellen auf gebundene Hybridom-Antikörper im Durchflusszytometer (Becton Dickinson) getestet werden. Klone mit bindenden Antikörpern wurden weiter kultiviert

und in gleicher Weise auf Bindung an lebende Jurkat T-Zellen geprüft. Hybridome, deren Überstände Antikörper mit Bindung an apoptotische und nicht an lebende Jurkat T-Zellen aufwiesen, wurden vereinzelt und weiter kultiviert.

### 2.2.8 Vereinzeln der Hybridome

Die erfolgreich getesteten Kulturen der Hybridomzellen wurden mehrfach vereinzelt, um den monoklonalen Ursprung zu gewährleisten. Dazu wurden die Zellen in einer Verdünnung von 0.1 Zelle pro Milliliter Kultur-Medium und 100 µL pro Loch in 96-Loch Zellkulturplatten kultiviert. In den Platten sollten in weniger als 1/3 aller Löcher Hybridomzellen wachsen, so dass die gewachsenen Klone mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von  $>0,9$  aus einer einzigen Vorläuferzelle – also monoklonalen Ursprungs sind (Coller & Coller 1983). Nach Vereinzeln wurden die Antikörper in den Überständen der Klone wiederum getestet (siehe 2.2.7).

### 2.2.9 Kokultur-Experimente

Für Kokultur-Experimente mit dendritischen Zellen und apoptotischen Zellen wurden je  $1 \times 10^5$  unreife dendritische Zellen nach sechstägiger Differenzierung in 500 µl Medium in 48-well-Platten gesetzt und ü.N. kultiviert. In einigen Experimenten wurden anstelle der dendritischen Zellen  $1 \times 10^5$  U-937 Zellen nach Differenzierung mit PMA (10 µg/ml für 3 Tage) eingesetzt. Zu den Kulturen wurden dann  $1 \times 10^6$  apoptotische Neutrophile bzw.  $2 \times 10^5$  apoptotische Jurkat-T-Zellen in 250 µl Medium gegeben. Um früh-apoptotische Zellen zu erhalten, wurden Neutrophile für 12-16 h nach Präparation in RPMI 1640-Medium/10 % FBS kultiviert, während Jurkat T-Zellen nach Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Strahlung für 2 h in RPMI 1640-Medium/10 % FBS kultiviert wurden.

Die Kokulturen der dendritischen Zellen und apoptotischen Zellen wurden für 4 h inkubiert. Für die Blockierung von Annexin I wurden die apoptotischen Zellen mit jeweils 10-20 µg/ml (bezogen auf das Endvolumen der Kokultur) DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten vorinkubiert. Die apoptotischen Zellen wurden daraufhin zusammen mit den F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten direkt zu den dendritischen Zellen gegeben. Nach 4 h wurde zur Reifung der dendritischen Zellen bakterielles Lipopolysaccharid (aus *E.coli* 026:B6, Sigma) in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. In einigen Experimenten wurden Lipoteichonsäure (1 µg/ml, Sigma) bzw. Poly (I:C) (10 µg/ml,

Sigma) anstelle von LPS eingesetzt. Nach 16 h wurden aus den Kokulturen jeweils 350 µl Überstand abgenommen und der Gehalt an TNF- $\alpha$  bzw. Interleukin-10 im ELISA bestimmt. Nach 48 h wurden die Zellen abgenommen. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Analyse im Durchflusszytometer (Becton Dickinson) bestimmt.

### 2.2.10 Phagozytose-Experimente

Für Experimente zur Phagozytose apoptotischer Zellen wurden  $2 \times 10^5$  differenzierte U-937-Zellen (10ng/ml PMA für 3 Tage) in 24-Loch-Zellkulturplatten mit 1 ml RPMI 1640-Medium/10 % FBS kultiviert. Jurkat T-Zellen wurden mit dem Membranfarbstoff PKH-26 (Sigma) nach Herstellerangaben gefärbt und mit  $4 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter in RPMI 1640-Medium/10 % FBS aufgenommen. Nach Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Strahlung wurden die Jurkat T-Zellen 4 h inkubiert. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  apoptotische Jurkat T-Zellen (500 µl) zu den U-937-Zellen gegeben. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten zusammen kultiviert. Anschließend wurden die U-937-Zellen auf Eis abgeschabt und mit einem FITC-gekoppelten anti-CD31-Antikörper gefärbt. Die Messung der Phagozytose erfolgte durch Analyse der roten PKH-26-Fluoreszenz (FL-2) von CD31-positiven Zellen.

### 2.2.11 T-Zell-Stimulation

Für Experimente zur Stimulation naiver, syngener T-Zellen wurden primäre dendritische Zellen und primäre T-Zellen eines Spenders präpariert. Jeweils  $2 \times 10^5$  unreife dendritische Zellen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten mit 10 µg/ml Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG, von Robert A. Harris, Karolinska Institut, Schweden freundlicherweise für Versuche zur Verfügung gestellt) sowie  $1 \times 10^6$  apoptotischen T-Zellen (nach Behandlung mit 300 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Strahlung und Inkubation für 7 h) für 4 h inkubiert. Zur Blockierung von Annexin I wurde den apoptotischen T-Zellen in einigen Ansätzen zusätzlich 20 µg/ml DAC5 F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente zugegeben. Nach Inkubation für 24 h wurden zu den Kulturen jeweils  $2 \times 10^6$  naive, CD4-positive T-Zellen gegeben. Die CD4-positiven T-Zellen wurden zuvor mit Hilfe magnetischer anti-CD8-Dynalbeads nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich naive T-Zellen ohne dendritische Zellen angesetzt. Die Kulturen wurden für 5 Tage kultiviert, anschließend 3 x mit sterilem

PBS gewaschen und erneut für 5 Tage unter Zusatz von 10 U/ml Interleukin-2 kultiviert. Darauf wurden die T-Zellen mit PBS gewaschen, gezählt und mit reifen, syngenen dendritischen Zellen und MOG restimuliert. Zur Kontrolle wurden die gleichen T-Zellen mit allogenen, reifen dendritischen Zellen restimuliert. Die Restimulation erfolgte in 96-Loch-Zellkulturplatten mit jeweils 50.000 T-Zellen und 10.000 bis 1111 reifen dendritischen Zellen. Nach 3 Tagen wurde die Proliferation der T-Zellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt.

### 2.2.12 Immunfluoreszenz von Oberflächenmolekülen

Zur Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker wurden  $3\text{-}5 \times 10^5$  Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei  $1500 \times g$  pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen für 30 min mit je  $50 \mu\text{l}$  Erstantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$ , um eine Internalisierung der Oberflächenmoleküle zu verhindern. Dabei wurden Überstände von Hybridom-Kulturen unverdünnt und gereinigte, monoklonale Antikörper in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  in FACS-Puffer eingesetzt. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimalige Zugabe von  $1 \text{ ml}$  FACS-Puffer und fünfminütige Zentrifugation bei  $1500 \times g$  und anschließendes Dekantieren des Überstandes entfernt. Falls der Erstantikörper nicht fluoreszenzmarkiert war, wurden die Zellen in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) wie vorher gefärbt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit je  $1 \text{ ml}$  FACS-Puffer gewaschen und für die Analyse im Durchflusszytometer (Becton Dickinson) in  $100 \mu\text{l}$  FACS-Puffer analysiert. Für die Analyse von Annexin I und Phosphatidylserin wurde anstelle des FACS-Puffers jeweils Annexin-Bindungspuffer/ $10\%$  FBS verwendet.

Bei der Analyse primärer dendritischer Zellen wurden die  $F_c$ -Rezeptoren der Zellen durch eine Inkubation mit FACS-Puffer/ $10\%$  Mausserum (Caltag, Hamburg) für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  abgesättigt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software WinMDI (<http://facs.scripps.edu/>).

### 2.2.13 Radioaktive Bestimmung der Zell-Proliferation

Die Messung der Proliferation von T-Zellen erfolgte durch Inkubation mit radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin. Das markierte Nukleosid wird in die DNA proliferierender Zellen eingebaut, so dass die gemessene Radioaktivität nach Waschen der Zellen proportional der Proliferation ist. Die Experimente wurden mit  $5\text{-}10 \times 10^4$  T-Zellen in 96-Loch-Zellkulturplatten durchgeführt. Zu jeweils 200  $\mu\text{l}$  Zellkultur wurden 10  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin in RPMI 1640-Medium ( $c=1$  mCi/ml) gegeben. Die Zellen wurden für 12-16 h mit  $^3\text{H}$ -Thymidin unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend gewaschen. Die Radioaktivität der Zellen wurde durch Übertragen auf Filterpapier in einem Harvester (Tomtec, Hamdon, USA) und anschließende Messung in einem Szintillationszähler (Wallac, Gaithersburg, USA) bestimmt.

### 2.2.14 Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti

Mit Hilfe einer von Nicoletti *et al.* (1991) etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden (Nicoletti *et al.* 1991). Dazu wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen in 250  $\mu\text{l}$  eines hypotonischen Fluorochrompuffers (0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 50  $\mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid) für 12-72 h bei 4 °C unter Lichtabschluss lysiert. Die Lyse unter diesen Bedingungen ermöglicht die Diffusion gespaltener DNA-Fragmente aus dem Zellkern apoptotischer Zellen, während intakte DNA lebender Zellen vollständig im Kern verbleibt. 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 ließen sich daher im FL-2-Detektor des Durchflusszytometers die apoptotischen Zellkerne mit subdiploidem DNA-Gehalt quantifizieren. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet:  $[(\% \text{ experimentelle Apoptose} - \% \text{ spontane Apoptose}) / (100 - \% \text{ spontane Apoptose})] \times 100$ .



### 2.2.15 Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials beruht auf membrangängigen kationischen Fluoreszenzfarbstoffen, die sich spezifisch in Mitochondrien anreichern, wenn deren Transmembranpotential intakt ist. Eine hohe Fluoreszenzintensität zeigt demnach eine intakte, lebende Zelle an. Während der Apoptose bricht das mitochondriale Transmembranpotential zusammen, sodass sich die Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr in den Mitochondrien anreichern. Der Farbstoff JC-1 besitzt zusätzlich die Eigenschaft, bei hohen Konzentrationen Aggregate zu bilden, sogenannte J-Aggregate. Diese fluoreszieren bei 590 nm, wohingegen das monomere JC-1 bei 527 nm fluoresziert. Apoptotische Zellen zeigen daher gegenüber lebenden Zellen eine Abnahme in Fluoreszenz-2 (FL-2) und eine Zunahme in Fluoreszenz-1 (FL-1) des FACScans. Der spezifische Verlust  $\Delta\Psi_M$  wurde analog der in 2.2.14 beschriebenen Formel berechnet.

#### **Färbung mit JC-1**

0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden mit 5 µg/ml JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid, 1 mg/ml in DMSO) versetzt und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt, pelletiert (1500 x g, 5 min, RT) und mit 1 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und direkt im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.2.16 Transfektion mit gegen Annexin I gerichteten siRNA-Sequenzen

Die Transfektion von Jurkat T-Zellen mit gegen Annexin I gerichteten siRNA-Sequenzen wurde von Dr. Diana Macasev durchgeführt. Die Zellen wurden freundlicherweise für die gezeigten Versuche zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sequenzen der siRNAs wurden dafür zunächst in den pSuper-Vektor (OligoEngine, Seattle, USA) eingefügt.

*forward*-Sequenz: 5'-GAT-CCC-CAG-CCA-TCC-TGG-ATG-AAA-CCT-TCA-AGA-GAG-GTT-TCA-TCC-AGG-ATG-GCT-TTT-TTA-3'

*reverse*-Sequenz: 5'-AGC-TTA-AAA-AAG-CCA-TCC-TGG-ATG-AAA-CCT-CTC-TTG-AAG-GTT-TCA-TCC-AGG-ATG-GCT-GGG-3'

Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation mit dem Nucleofector-System (Amaxa, Köln) und dem Nucleofector Kit V nach Angaben des Herstellers. Die Effizienz der Transfektion in diesem System konnte durch Expression des fluoreszierenden Proteins GFP detektiert werden und betrug 20 – 50 %.

### 2.2.17 Präparation von zytosolischen Extrakten

Für die Präparation zytosolischer Extrakte wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 40-200  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile der Lysate wurden anschließend für 30 min bei 15.000 x g pelletiert, und die geklärten Überstände in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lysate wurden entweder direkt in einer Immunpräzipitation oder SDS-PAGE eingesetzt bzw. zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.18 Markierung von Antikörpern mit Fluorescein-Isothiocyanat

Um Antikörper direkt im Durchflusszytometer nachweisen zu können, wurden sie mit dem Autofluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert. Dazu wurde 1 mg FITC (Sigma) in 1 ml DMSO (Sigma) im Dunkeln gelöst. Zu der Antikörperlösung (ca. 1 mg/ml in PBS) wurde 1/36 Volumen Natriumbicarbonatpuffer (17.3 g/l  $\text{NaHCO}_3$  + 8.6 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) gegeben sowie 100  $\mu$ l FITC/DMSO-Lösung je Milligramm Antikörper. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zum Abtrennen von ungebundenem FITC wurde das Gemisch über eine Gelfiltrationssäule gegeben (PD10, Amersham-Buchler). Die Antikörperbande wurde fraktioniert und Fraktionen mit der stärksten Färbung vereinigt. Der markierte Antikörper wurde mit PBS auf 1 mg/ml Proteingehalt eingestellt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### III. Ergebnisse

#### 1. *Herstellung eines Antikörpers gegen apoptotische Zellen*

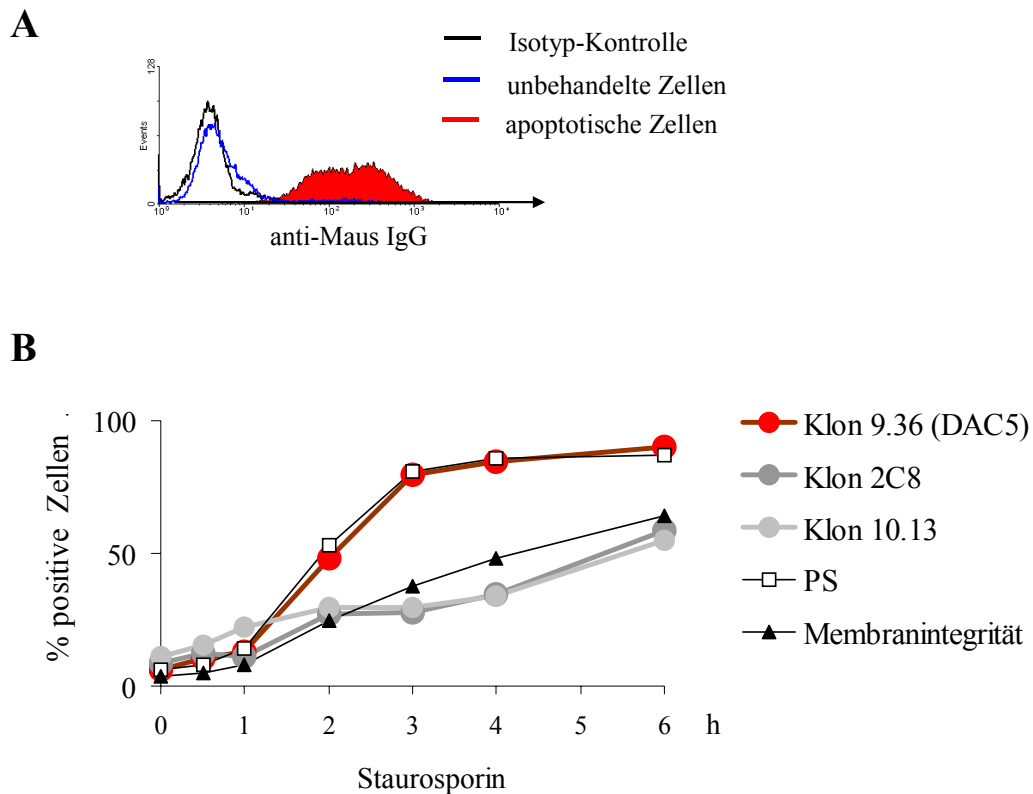
Im Verlauf der Apoptose verändert sich die Oberfläche einer sterbenden Zelle deutlich. Neben der Exposition von Phosphatidylserin sind mehrere spezifische Oberflächenstrukturen beschrieben, die eine apoptotische Zelle charakterisieren und letztlich zur schnellen Aufnahme der sterbenden Zelle durch Zellen des Immunsystems führen. In der Regel wird durch die Aufnahme apoptotischer Zellen keine Entzündung ausgelöst, dementsprechend sind in der Literatur anti-inflammatorische Effekte apoptotischer Zellen bis hin zur Induktion von Toleranz beschrieben worden (Savill et al. 2002; Steinman & Nussenzweig 2002). Signale für die Aufnahme apoptotischer Zellen werden größtenteils durch apoptosespezifische Oberflächenmoleküle vermittelt (Lauber et al. 2004). Daher liegt es nahe, dass auch die weiteren Interaktionen apoptotischer Zellen mit dem Immunsystem auf spezifischen Oberflächenmolekülen beruhen, welche die Zellen des Immunsystems – insbesondere dendritische Zellen – beeinflussen und so die Auslösung einer Immunantwort inhibieren können. Bisher sind jedoch die molekularen Ursachen und Mechanismen der Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen größtenteils nicht bekannt.

Um die Wechselwirkungen apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen auf molekularer Ebene untersuchen zu können, wurden daher monoklonale Antikörper gegen apoptotische Zellen hergestellt. Die Antikörper beziehungsweise die von den Antikörpern gebundenen Moleküle wurden zunächst in Relation mit bekannten Apoptose-Parametern untersucht. Der besonders früh im Verlauf der Apoptose bindende Antikörper DAC5 (*D*etector of *A*poptotic *C*ells Nr. 5) wurde daraufhin für weitere Studien zur Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen ausgewählt.

### 1.1 Der Antikörper DAC5 bindet an früh-apoptotische Zellen *in vitro*

Um Antikörper gegen apoptotische Zellen zu gewinnen, wurden insgesamt acht C57BL/6-Mäuse mit apoptotischen Jurkat T-Zellen immunisiert. Aus den Milzzellen wurden durch Fusion mit Myelomzellen Hybridome erzeugt, deren Zellkultur-Überstände durchflusszytometrisch auf sekretierte Antikörper mit spezifischer Bindung an apoptotische Jurkat T-Zellen untersucht wurden. Klone, in deren Überständen Antikörper mit Bindung an apoptotische, aber nicht an lebende Zellen nachweisbar waren, wurden vereinzelt und weiter untersucht (Abb. III.1A). Von ca. 8.000 getesteten Hybridom-Überständen konnten letztlich drei Klone identifiziert werden, deren Überstände apoptose-spezifische Antikörper enthielten (Abb. III.1B). Für die weitere Untersuchung wurde der Klon 9.36 / DAC5 gewählt, da der Antikörper – vergleichbar Annexin V – bereits an früh-apoptotische Zellen band, deren Membran noch intakt war. Die meisten DAC5-positiven Zellen wurden daher in diesem frühen Stadium noch nicht von Propidiumiodid gefärbt.

In Tabelle III.1.1 sind humane Zelllinien und primäre Zellen zusammengestellt, die auf Bindung von DAC5 untersucht wurden. Apoptotische Zellen, die Phosphatidylserin exponieren, wurden ebenfalls von DAC5 gebunden, während B-Zelllinien (die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji und die B-Lymphoblastoide Zelllinie SKW6.4), die im Verlauf der Apoptose keine oder nur sehr wenig Phosphatidylserin-Exposition aufweisen (Kagan et al. 2002), nicht gebunden wurden. Phagozytierende Zellen wie primäre Makrophagen, dendritische Zellen und die Zelllinie U-937 (nach Differenzierung mit PMA) weisen auch ohne Auslösung der Apoptose Phosphatidylserin auf ihrer Membranaußenseite auf (Callahan et al. 2003). Diese Zellen wurden auch ohne Induktion der Apoptose von DAC5 gebunden, sodass bei allen untersuchten Zellen die Bindung von DAC5 mit der Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran einherging. Eine Bindung von DAC5 an apoptotische murine Zelllinien konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. III.1: DAC5 bindet an früh-apoptotische Zellen.** A, Jurkat T-Zellen wurden für 5 h mit 1  $\mu$ M Staurosporin inkubiert (apoptotische Zellen) oder unbehandelt gelassen und mit dem Überstand des Klons 9.36 bzw. mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps inkubiert (Isotypkontrolle). Gebundene Antikörper wurden mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten anti-Maus-IgG Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. B, Jurkat T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 1  $\mu$ M Staurosporin inkubiert und mit den Überständen der genannten Hybridome inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem fluoreszenzmarkierten anti-Maus-IgG Antikörper durchflusszytometrisch detektiert. Die Phosphatidylserin-Externalisierung (PS) und Membranintegrität der Zellen wurden durch Färbung mit Annexin V bzw. Propidiumiodid nachgewiesen.

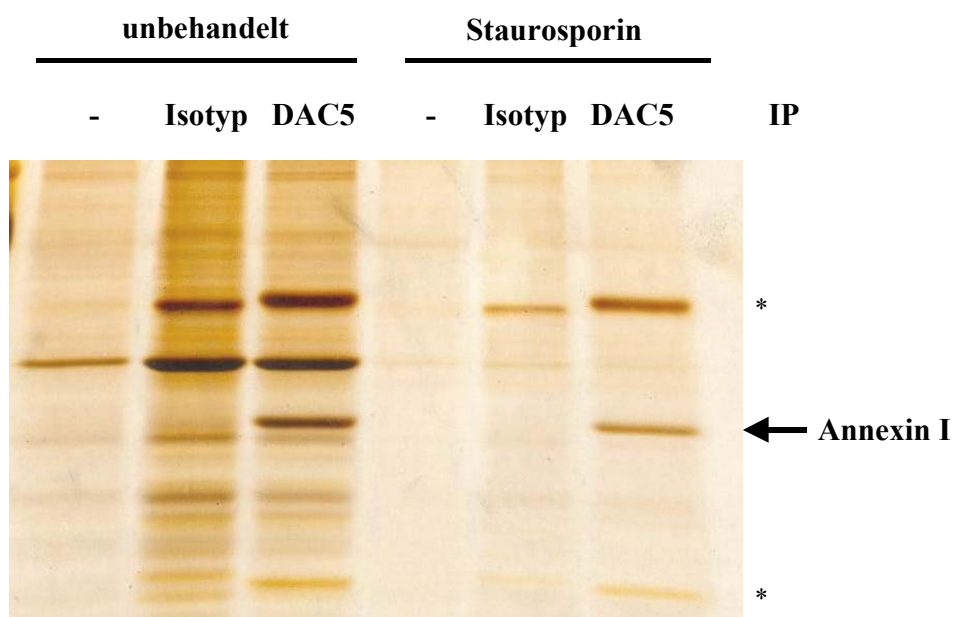
Zelltyp		Stimulus	DAC5-Bindung	PS-Exposition
Jurkat	T-Zell-Lymphom	Staurosporin UV-Bestrahlung $\gamma$ -Bestrahlung anti-APO-1	+++	+++
CEM	T-Zell-Lymphom	Staurosporin UV-Bestrahlung $\gamma$ -Bestrahlung anti-APO-1	++++	++++
Raji	B-Zell-Lymphom	anti-APO-1	-	-/+
SKW6.4	Burkitt-Lymphom	Staurosporin anti-APO-1	-	-/+
HeLa	Cervix-Karzinom	Staurosporin	+	+
A-375	Melanom	Staurosporin UV-Bestrahlung	+++	+++
U-937	Histiozytisches Lymphom	PMA	++	++
Aktivierte T-Zellen		anti-APO-1 UV-Bestrahlung	+++	+++
Neutrophile Granulozyten		Entzug von Wachstumsfaktoren	++++	++++
Makrophagen		-	++	++
Dendritische Zellen		-	+	+

**Tab. III.1: DAC5-Bindung und Phosphatidylserin (PS)-Exposition verschiedener Zellen und Zelllinien.** Die angegebenen Stimuli beziehen sich auf Inkubation mit 1  $\mu$ M Staurosporin, 1  $\mu$ g/ml anti-APO-1 bzw. 200 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Strahlung oder 150 Gray radioaktiver  $\gamma$ -Strahlung. U-937-Zellen wurden mit 50  $\mu$ g/ml PMA innerhalb von 3 Tagen differenziert. Neutrophile Granulozyten wurden für 2 Tage *ex vivo* in RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS kultiviert.

## 2. *Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen*

### 2.1 Der Antikörper DAC5 bindet an das Protein Annexin I

Zur Identifizierung des Antigens von DAC5 wurde der Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt und in einer Immunpräzipitation mit Lysaten aus apoptotischen und unbehandelten Jurkat T-Zellen eingesetzt. Die Auftrennung der DAC5-Präzipitate in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung wies in beiden Fällen eine ca. 37 kD große Proteinbande auf (Abb. III.2). Diese Bande konnte in den Kontrollpräzipitationen mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps beziehungsweise mit Protein A-Sepharose allein nicht nachgewiesen werden. Die 37 kD-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein durch tryptischen Verdau mit anschließender Massenspektroskopie als Annexin I identifiziert (Massenspektroskopische Daten siehe Anhang V.2).



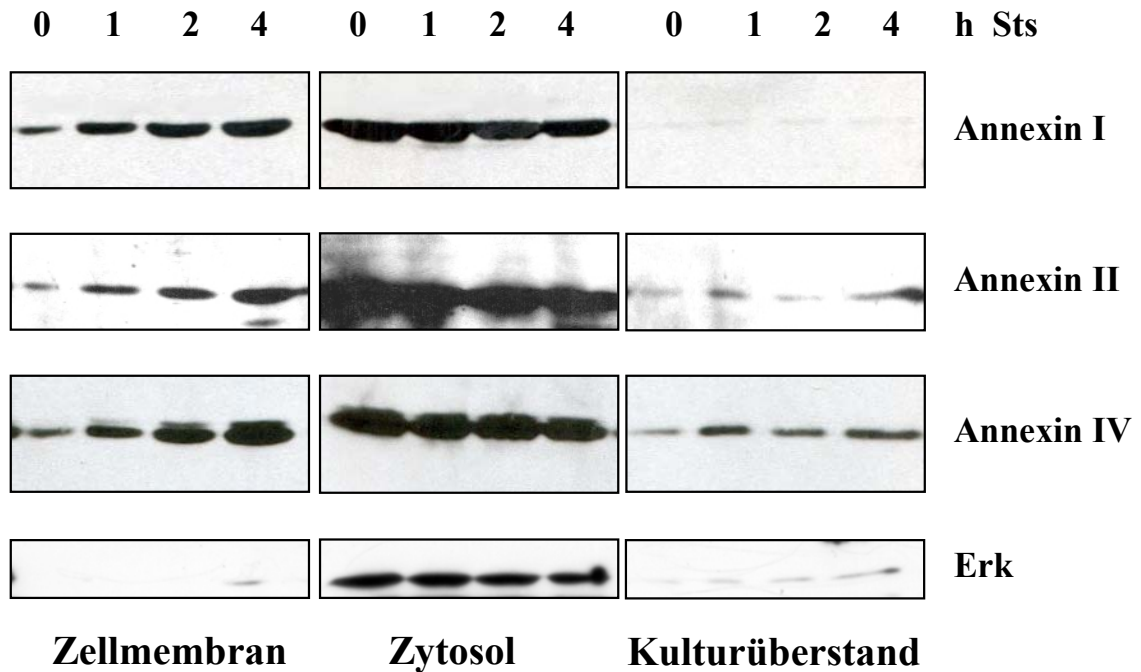
**Abb. III.2: DAC5 bindet an das Protein Annexin I.** Lysate von Jurkat T-Zellen wurden unbehandelt bzw. nach 4-stündiger Inkubation mit 1 $\mu$ M Staurosporin in einer Immunpräzipitation mit gereinigtem DAC5-Antikörper und Protein A-Sepharose eingesetzt (DAC5). Als Kontrollen wurde ein Antikörper des gleichen Isotyps (Isotyp) bzw. Protein A-Sepharose alleine (-) verwendet. Die Proteine der Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung nachgewiesen. Die DAC5-spezifischen Proteinbanden (Pfeil) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und durch eine massenspektroskopische Analyse als Annexin I identifiziert. \* = schwere und leichte Kette der Antikörper

### 2.2 Annexin I, II und IV werden während der Apoptose auf die äußere Seite der Zellmembran transportiert

Annexin I gehört zur Familie der lipid- und kalziumbindenden Annexine (Gerke & Moss 2002). Strukturell und funktionell kann das Protein in den ca. 40 Aminosäuren umfassenden N-Terminus und die lipidbindende Kerndomäne unterteilt werden. Da das Protein in Gesamtzell-Lysaten aus apoptotischen wie auch aus unbehandelten Zellen mit DAC5 präzipitiert werden konnte (Abb. III.2), kommt ein apoptosespezifisches Neo-Epitop in Annexin I nicht als DAC5-Bindungsstelle in Frage. Wie bereits nach Zugabe von Glucocorticoiden beziehungsweise Hormonen beobachtet wurde, kann Annexin I unter bestimmten Bedingungen externalisiert werden (Solito et al. 1994; Castro-Caldas et al. 2001). Dass Annexin I auch im Verlauf der Apoptose auf die äußere Seite der Zellmembran transportiert wird, konnte in Waschexperimenten mit EDTA-haltigem Puffer bestätigt werden. Durch die Chelatierung des Kalziums wurde die Lipidbindung des extrazellulären Annexin I aufgehoben, sodass mit fortschreitender Apoptose ein steigender Anteil an extrazellulärem, membrangebundenem Annexin I in den Waschfraktionen nachgewiesen werden konnte (Abb. III.3).

Alle Annexine weisen innerhalb der Kerndomäne eine hohe Homologie auf und binden sowohl Kalzium als auch negativ geladene Lipide (Raynal & Pollard 1994). Falls die Externalisierung von Annexin I maßgeblich von den lipidbindenden Eigenschaften der Kerndomäne beeinflusst wird, könnten auch andere Annexine im Verlauf der Apoptose externalisiert werden. Deshalb wurden die Waschfraktionen zusätzlich in Hinsicht auf extrazelluläres Annexin II und Annexin IV untersucht. Dabei konnte in den Waschfraktionen ebenfalls ein steigender Gehalt von Annexin II und IV nachgewiesen werden (Abb. III.3). Der intrazelluläre Gehalt aller untersuchten Annexine war weit höher als die externalisierte Menge der Proteine und verringerte sich im Verlauf der Apoptose nur wenig. Hingegen fand sich in den Zellkultur-Überständen kein sekretiertes Annexin I und nur geringe Mengen der Annexine II und IV. Zur Kontrolle wurden alle Fraktionen zusätzlich auf den Gehalt des zytosolischen Proteins Erk untersucht. Erk besitzt mit ca. 44 kD ein ähnliches Molekulargewicht wie Annexin I, und konnte nur intrazellulär aber nicht in den Waschfraktionen und nur in äußerst geringer Menge im Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden. Daher führte die Behandlung mit EDTA-haltigem Puffer nicht zu einem unspezifischen „Auswaschen“ zytosolischer Bestandteile der Zellen.





**Abb. III.3: Annexin I, II und IV binden auf der äußeren Zellmembran apoptotischer Zellen.** Jurkat T-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit  $1\mu\text{M}$  Staurosporin (Sts) inkubiert, anschließend mit kaltem EDTA-PBS gewaschen und lysiert. Nach Auftrennung der Waschfraktionen (Zellmembran), Lysate (Zytosol) und Zellkultur-Überstände in einer SDS-PAGE wurde im Westernblot der Gehalt von Annexin II, Annexin IV und Erk in den Fraktionen mit spezifischen Antikörpern analysiert. Für die Detektion von Annexin I wurde nicht DAC5, sondern ein kommerziell erhältlicher anti-Annexin I Antikörper verwendet, da DAC5 im Westernblot eine geringere Sensitivität aufweist.

### 2.3 Annexin I wird früh im Verlauf der Apoptose externalisiert

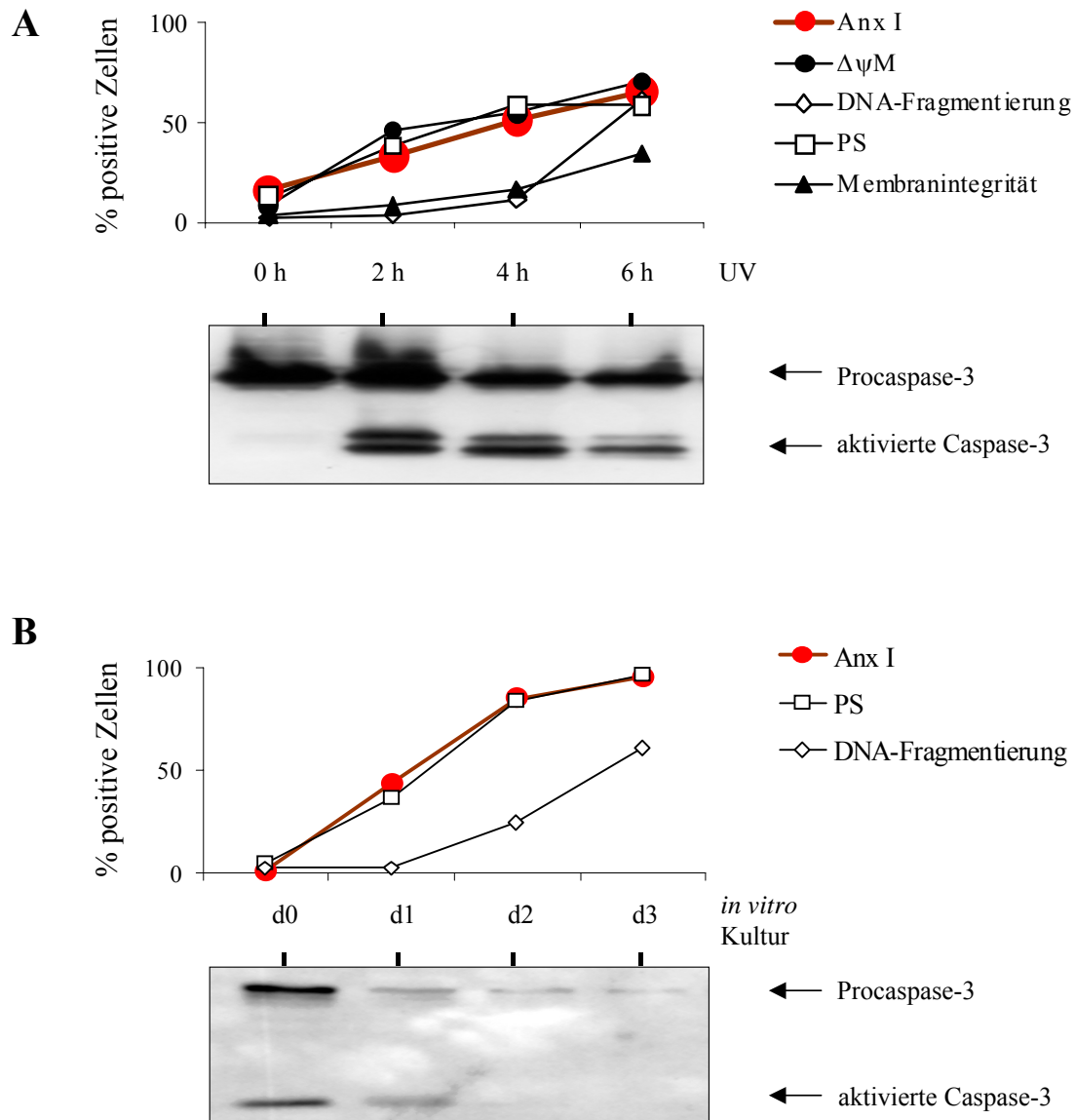
Die Externalisierung von Annexin I im Verlauf der Apoptose wurde *in vitro* weiter mit Hilfe des Antikörpers DAC5 untersucht. Dazu wurden in Jurkat T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach UV-C-Bestrahlung verschiedene Parameter der Apoptose bestimmt und mit der Annexin I-Exposition verglichen (Abb. III.4). UV-C-Strahlung induziert den intrinsischen Apoptose-Signalweg unter Beteiligung der Mitochondrien (Scoltock & Cidlowski 2004), sodass zu einem frühen Zeitpunkt das Mitochondrienpotential ( $\Delta\Psi_M$ ) abfällt. Zusätzlich zu  $\Delta\Psi_M$  wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin als ein weiteres früh-apoptotisches Kennzeichen sowie die Fragmentierung der DNA als spät-apoptotisches Merkmal gemessen (Verhoven et al. 1995). Um den Grad der Aktivierung von Effektorcaspasen zu bestimmen, wurde im Westernblot die Spaltung der Effektorcaspase-3 detektiert. Es zeigte sich, dass

Annexin I auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen exponiert wird, sobald diese Phosphatidylserin exponieren und noch bevor die DNA fragmentiert ist (Abb. III.4A). Übereinstimmend mit der Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalweges war das Mitochondrienpotential der Annexin I-exponierenden Zellen ebenfalls zerstört. Bereits zwei Stunden nach UV-Bestrahlung war ebenfalls ein Teil der Caspase-3 aktiviert, erkennbar an den kleineren Fragmenten des aktiven Caspase-3 Heterotetramers und der durch die Prozessierung abnehmenden Procaspase-3-Bande.

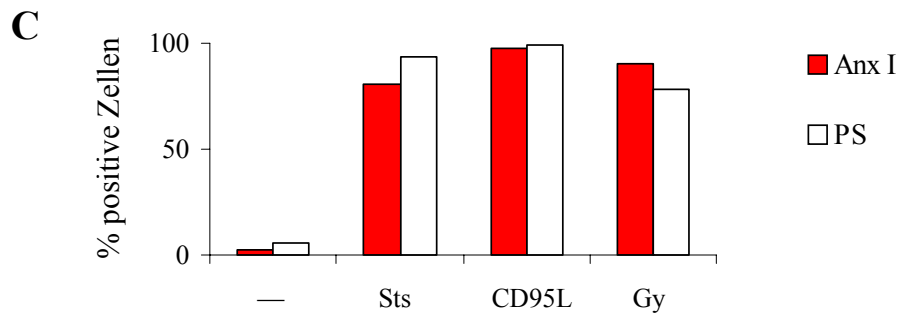
Als weiteres Modell für die Untersuchung der Exposition von Annexin I während der Apoptose wurden primäre humane neutrophile Granulozyten hinzugenommen, da diese Zellen einen großen Teil der apoptotischen Zellen ausmachen, die unter physiologischen Bedingungen im Körper auftreten. Neutrophile stellen mit 70 bis 80 Prozent den größten Teil der Leukozyten im Blut. Ihre Lebensdauer beträgt *in vivo* nur wenige Stunden, sodass täglich eine große Zahl Neutrophile apoptotisch stirbt und entsorgt werden muss (Bicknell et al. 1994; Shi et al. 2001). Zudem enthalten diese Zellen sehr viel Annexin I (bis zu vier Prozent des Gesamtproteins (Perretti & Flower 2004)), das auch bei diesen Zellen während der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran gelangt und dort mit dem Antikörper DAC5 nachgewiesen werden konnte (Abb. III.4B). Für die Induktion der Apoptose bedarf es keines gesonderten Stimulus, da bei der Kultivierung der Neutrophilen *in vitro* durch Entzug von Wachstumsfaktoren spontan Apoptose ausgelöst wird. Im Vergleich zu den untersuchten T-Zelllinien ist der Verlauf der Neutrophilen-Apoptose jedoch wesentlich langsamer und erstreckt sich über mehrere Tage. Ähnlich wie bei Jurkat T-Zellen verläuft bei Neutrophilen die Externalisierung von Annexin I analog der Exposition von Phosphatidylserin, während die DNA auch bei diesen Zellen erst später gespalten wird. Die Effektorcaspase-3 war in frisch präparierten Neutrophilen teilweise aktiviert, und wurde mit fortschreitender Apoptose weiter prozessiert (Abb. III.4B).

Um den Einfluss verschiedener Apoptose-Signalwege auf die Externalisierung von Annexin I zu untersuchen, wurde Apoptose in Jurkat T-Zellen durch Inkubation mit Staurosporin oder durch radioaktive  $\gamma$ -Strahlung beziehungsweise Inkubation mit Leucin-Zipper-CD95-Ligand ausgelöst (Abb. III.4C). Während Staurosporin und die radioaktive Bestrahlung den intrinsischen Apoptose-Signalweg einleiten (Scarlett et al. 2000; King & Cidlowski 1998), vernetzt der Leucin-Zipper-CD95-Ligand die CD95-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und induziert Apoptose über die Bildung des DISC

und der Aktivierung von Caspase-8 (Krammer 1998). In allen Fällen wurde Annexin I unabhängig von dem apoptoseauslösenden Stimulus externalisiert.



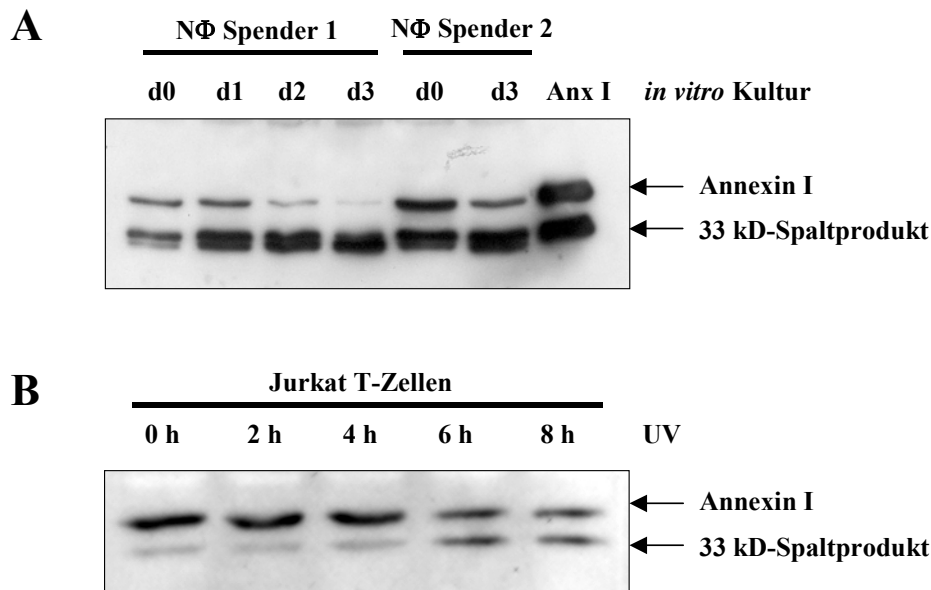
**Abb. III.4A und B: Die Externalisierung von Annexin I im Verlauf der Apoptose.** Die Annexin I-Exposition (Anx I) von UV-bestrahlten Jurkat T-Zellen (A) und *in vitro* kultivierten Neutrophilen (B) wurde zu den angegebenen Zeiten mit fluoreszenzmarkiertem DAC5 im Durchflusszytometer analysiert. Parallel wurden die Exposition von Phosphatidylserin (PS), die Membranintegrität und die Verringerung des Membranpotentials der Mitochondrien ( $\Delta\psi M$ ) durch Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V bzw. Propidiumiodid oder dem Farbstoff JC1 dargestellt. Der Grad der DNA-Fragmentierung wurde durch eine Analyse nach Nicoletti bestimmt. Zur Bestimmung der Spaltprodukte von Caspase-3 wurden Aliquots der Zellen lysiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen Caspase-3 entwickelt.



**Abb. III.4C: Die Externalisierung von Annexin I nach verschiedenen Apoptose-auslösenden Stimuli.** Jurkat T-Zellen wurden für 6 h mit 1  $\mu$ M Staurosporin (Sts) bzw. mit 200 ng/ml CD95-Ligand (CD95L) behandelt oder mit 150 Gray bestrahlt (Gy) und für weitere 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Annexin I- (Anx I) und Phosphatidylserin-Exposition (PS) der Zellen mit fluoreszenzgekoppeltem DAC5 bzw. Annexin V im Durchflusszytometer bestimmt.

## 2.4 Annexin I wird während der Apoptose gespalten

Annexin I ist sehr sensitiv gegenüber proteolytischen Enzymen und besitzt im N-Terminus mehrere Erkennungssequenzen für Proteasen (Barnes & Gomes 2002). Da eine entsprechende Spaltung den N-Terminus von dem lipidbindenden Kernfragment und damit von den apoptotischen Zellen trennen könnte, wurde die Integrität von Annexin I im Verlauf der Apoptose näher untersucht. Bei der Analyse von Zelllysaten apoptotischer Neutrophiler und apoptotischer T-Zellen konnte der Abbau des Proteins in ein 33 kD großes Fragment beobachtet werden (Abb. III.5). Die Größe des Fragmentes entspricht dem Molekulargewicht der Kerndomäne von Annexin I ohne die 40 Aminosäuren des N-Terminus und wird vom Antikörper DAC5, nicht aber von einem kommerziellen anti-Annexin I Antikörper gebunden (Abb. III.5B und III.3). Die Spaltung ist bei früh-apoptotischen Zellen nicht weit fortgeschritten, während Annexin I bei spät-apoptotischen Neutrophilen nach drei Tagen *in-vitro* Kultur fast vollständig zu dem 33 kD großen Spaltprodukt abgebaut wurde.



**Abb. III.5: Annexin I wird im Verlauf der Apoptose gespalten.** A, Humane Neutrophile von zwei verschiedenen Spendern wurden direkt nach Präparation der Zellen (d0) oder nach 1-3 Tagen *in vitro* Kultur (d1-d3) lysiert. Annexin I und das 33 kD Spaltprodukt in den Lysaten wurden im Vergleich mit rekombinantem Annexin I (Anx I) im Westernblot mit DAC5 nachgewiesen. B, Jurkat T-Zellen wurden mit 200 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C-Strahlung bestrahlt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Westernblot mit DAC5 analysiert.

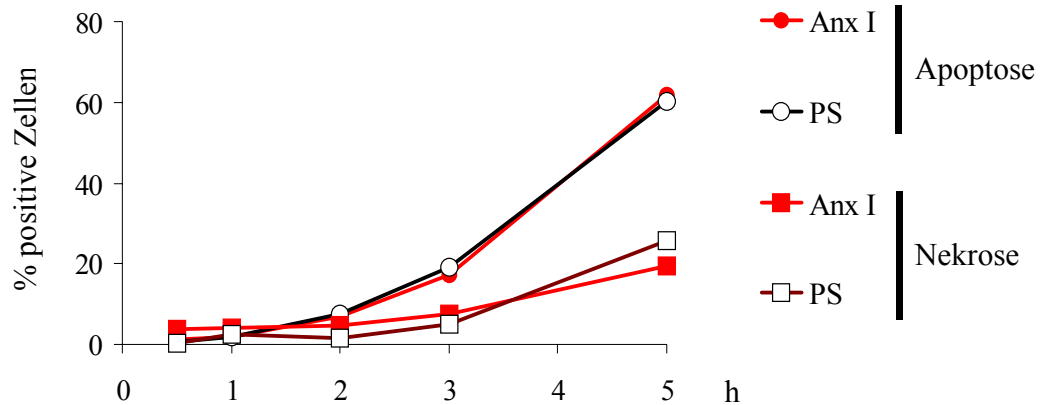
## 2.5 Die Exposition von Annexin I ist energieabhängig und kann durch NEM-Behandlung induziert werden

Der nekrotische Zelltod gilt im Gegensatz zur Apoptose als unregulierter und energieunabhängiger Vorgang, der zudem mit endzündlichen Prozessen einhergeht und pro-inflammatorische zelluläre Signalwege in Phagozyten aktivieren kann (Li et al. 2001a; Scaffidi et al. 2002). Um die Exposition von Annexin I unter nekrotischen Bedingungen zu untersuchen, wurde der zelluläre Energieträger ATP in Jurkat T-Zellen durch Kultivierung in glukosefreiem Kulturmedium und durch Blockierung der Atmungskette mit S-Nitroso-Glutathion depletiert. Nach Behandlung mit Staurosporin, das unter diesen Bedingungen Nekrose auslöst (Leist et al. 1999), wurde der Verlauf der Annexin I- und der Phosphatidylserin-Exposition gemessen. Abb. III.6A zeigt, dass die Exposition von Annexin I und Phosphatidylserin in den nekrotischen Zellen wesentlich langsamer als in den apoptotischen Kontrollzellen erfolgt. Zudem ist der Anteil von Zellen mit zerstörter Membran bei nekrotischen

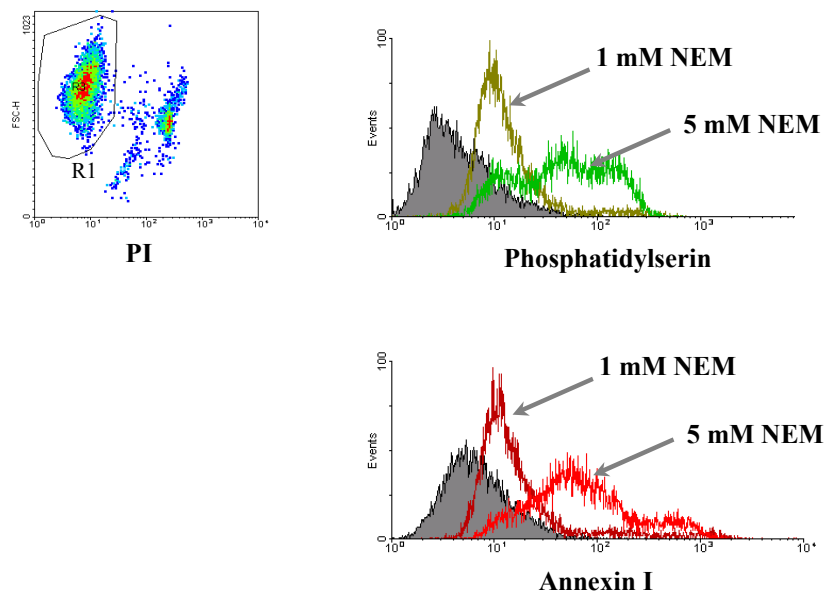
Zellen höher (Daten nicht gezeigt). Demnach verläuft die Externalisierung von Annexin I energieabhängig. Die schnelle Exposition von Annexin I und Phosphatidylserin unter apoptotischen, ATP-suffizienten Bedingungen unterscheidet sich zudem deutlich von den Vorgängen in nekrotischen Zellen, bei denen vor allem unregulierte und passive Mechanismen zum Tragen kommen (Fink & Cookson 2005).

Um die Bedingungen für die Exposition von Annexin I detaillierter zu untersuchen, wurden Jurkat T-Zellen mit dem thiolreaktiven Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) inkubiert. Bei dieser Behandlung führt die Alkylierung von Thiolgruppen in der Amino-Phospholipid-Translokase zu einer Inhibition des Enzyms. Zusätzlich wird durch NEM ein intrazellulärer Kalzium-Einstrom induziert (Waring et al. 1999). Die Inhibition des Phospholipid-Transporters und die kalziumabhängige Aktivierung der Scramblase-Aktivität bewirken in diesem Fall die Externalisierung von Phosphatidylserin unabhängig von einem apoptoseauslösenden Stimulus (Faddeel et al. 1999). Wie erwartet, führte eine kurzzeitige Behandlung mit NEM zur Externalisierung von Phosphatidylserin in Jurkat T-Zellen, deren Zellmembran noch intakt war (Abb. III.6B). Obwohl durch die Behandlung mit NEM keine DNA-Fragmentierung und daher vermutlich keine Aktivierung der Caspase-Kaskade auftritt (Waring et al. 1999), konnte auch Annexin I nach Behandlung mit NEM auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden. Daher scheint die Externalisierung von Annexin I in diesem Fall unabhängig von der Induktion der Apoptose wie auch von einer Aktivierung der Caspasen zu sein, wobei eine Beteiligung der Caspasen unter apoptotischen Bedingungen durch diese Ergebnisse nicht ausgeschlossen wird. Auch in diesem Experiment konnte – wie unter allen bisher untersuchten Bedingungen – eine sehr enge Korrelation zwischen der Exposition von Annexin I und der Exposition von Phosphatidylserin festgestellt werden.

A



B



**Abb. III.6: Die Exposition von Annexin I ist energieabhängig und kann durch NEM induziert werden.**

A, In ATP-depletierten Jurkat T-Zellen wurde Nekrose durch Zugabe von Staurosporin induziert, während in ATP-suffizienten Kontrollzellen mit Staurosporin Apoptose ausgelöst wurde. Die Exposition von Annexin I (Anx I) und Phosphatidylserin (PS) wurde mit fluoreszenzgekoppeltem DAC5 bzw. Annexin V nach den angegebenen Inkubationszeiten detektiert. B, Jurkat T-Zellen wurden für 15 min mit N-Ethyl-Maleimid (NEM) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid und fluoreszenzgekoppeltem DAC5 bzw. Annexin V gefärbt. Das Dichtediagramm zeigt die Propidiumiodid-gefärbten Zellen nach NEM-Inkubation. In den Histogrammen ist Oberflächen-Annexin I bzw. Phosphatidylserin auf Propidiumiodid-negativen Zellen (= R1 im Dichtediagramm) dargestellt.

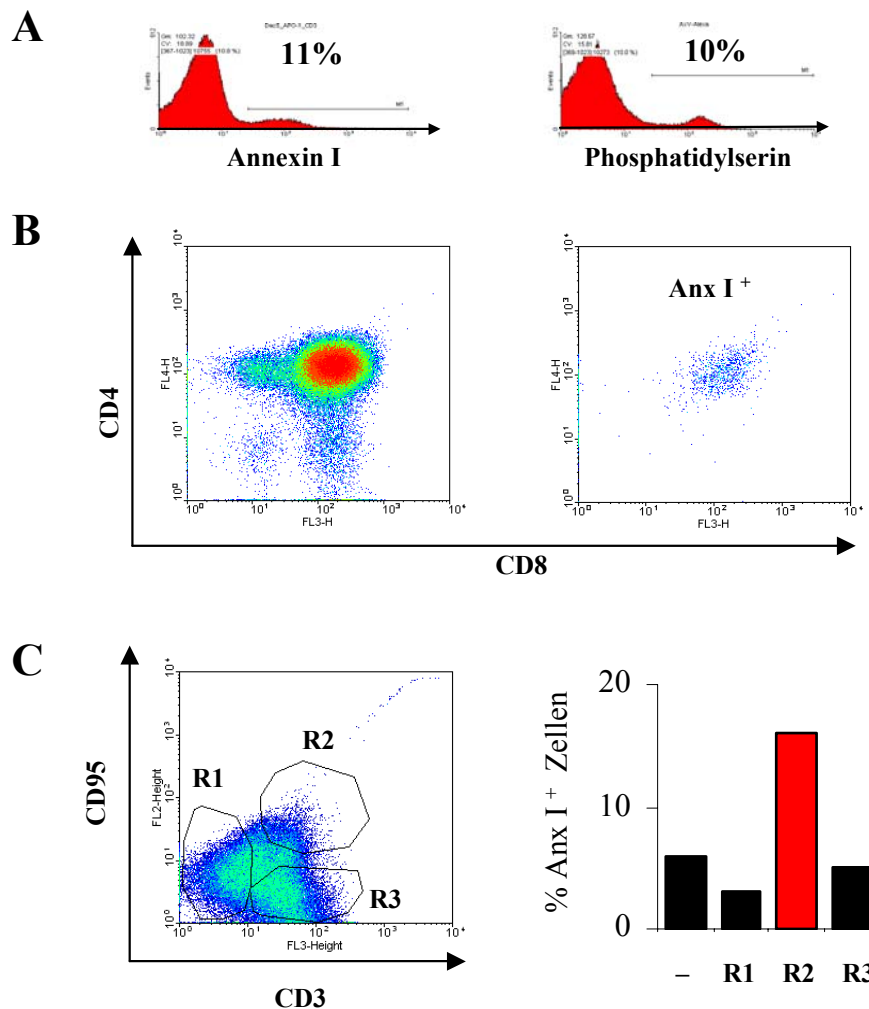
### 2.6 Annexin I ist *ex vivo* auf apoptotischen Thymozyten nachweisbar

Da sich der Verlauf der Apoptose und die Exposition von Annexin I *in vitro* und bei Zelllinien möglicherweise von Apoptose unter physiologischen Bedingungen unterscheidet, wurde die Exposition von Annexin I auf humanen Thymozyten *ex vivo* untersucht. Das Thymusgewebe wurde ausgewählt, weil dort im Rahmen der negativen und positiven Selektion eine hohe Zahl apoptotischer T-Zellen auftritt, die im Durchflusszytometer nachweisbar ist (Robey & Fowlkes 1994; Debatin et al. 1994). Während der Reifung im Cortex des Thymus durchlaufen die T-Zellen mehrere Stadien, die anhand von Oberflächenmolekülen charakterisiert werden können. Unreife Thymozyten exprimieren zunächst keinen der Korezeptoren CD4 und CD8 auf der Oberfläche (doppelt negative Zellen). Im Verlauf der Reifung können dann zunächst beide Moleküle auf der Oberfläche detektiert werden (doppelt positive Zellen), bevor letztendlich die reifen, naiven T-Zellen nur noch CD4 oder CD8 besitzen (einfach positive Zellen). Die Selektion erfolgt im Stadium der doppelt positiven Zellen, in welchem Thymozyten auch die Expression des T-Zell-Rezeptors erhöhen (Petrie et al. 1990). In dieser Phase werden mehr als 95 Prozent aller T-Zellen durch Apoptose eliminiert. Dabei handelt es sich um T-Zellen, die entweder kein Signal oder ein zu starkes Signal über ihren T-Zell-Rezeptor erhalten, da ihre T-Zell-Rezeptoren zu stark oder zu schwach an körpereigene Peptid-MHC-Komplexe binden (negative und positive Selektion).

Die Färbung mit DAC5 und Annexin V ergab jeweils einen Anteil von ca. 10 Prozent Annexin I- beziehungsweise Phosphatidylserin-positiver Zellen im Thymusgewebe (Abb. III.7A). Durch eine Doppelfärbung mit DAC5 und Annexin V konnte zusätzlich gezeigt werden, dass dieselben Zellen sowohl Phosphatidylserin als auch Annexin I exponieren (Daten nicht gezeigt). Die parallele Färbung mit DAC5 und anti-CD4- sowie anti-CD8-Antikörpern zeigte, dass sich Annexin I auf der Oberfläche der doppelt positiven Zellen befand (Abb. III.7B). Folglich konnte Annexin I auf jener Zellpopulation im Thymus detektiert werden, bei welcher der höchste Anteil apoptotischer Zellen zu erwarten ist. Demgegenüber fand sich Annexin I weder auf den unreifen, doppelt negativen Zellen noch auf den reifen, einfach positiven naiven T-Zellen. In Relation zur CD3- und CD95-Expression der Thymozyten befindet sich der höchste Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Population mit intermediärer CD3-, aber hoher CD95-Expression (Debatin et al. 1994). Damit übereinstimmend konnte in der beschriebenen Population, dem "apoptotischen Knie" (P.H. Krammer),



die höchste Prozentzahl Annexin I-positiver Zellen gefunden werden (Abb. III.7C). Die genannten Daten stehen im Einklang mit der Exposition von Annexin I auf apoptotischen Zellen unter physiologischen Bedingungen *in vivo*, da Annexin I exklusiv auf Zellpopulationen detektiert wurde, die nach unterschiedlichen Kriterien den höchsten Anteil apoptotischer Zellen *in vivo* beinhalten.

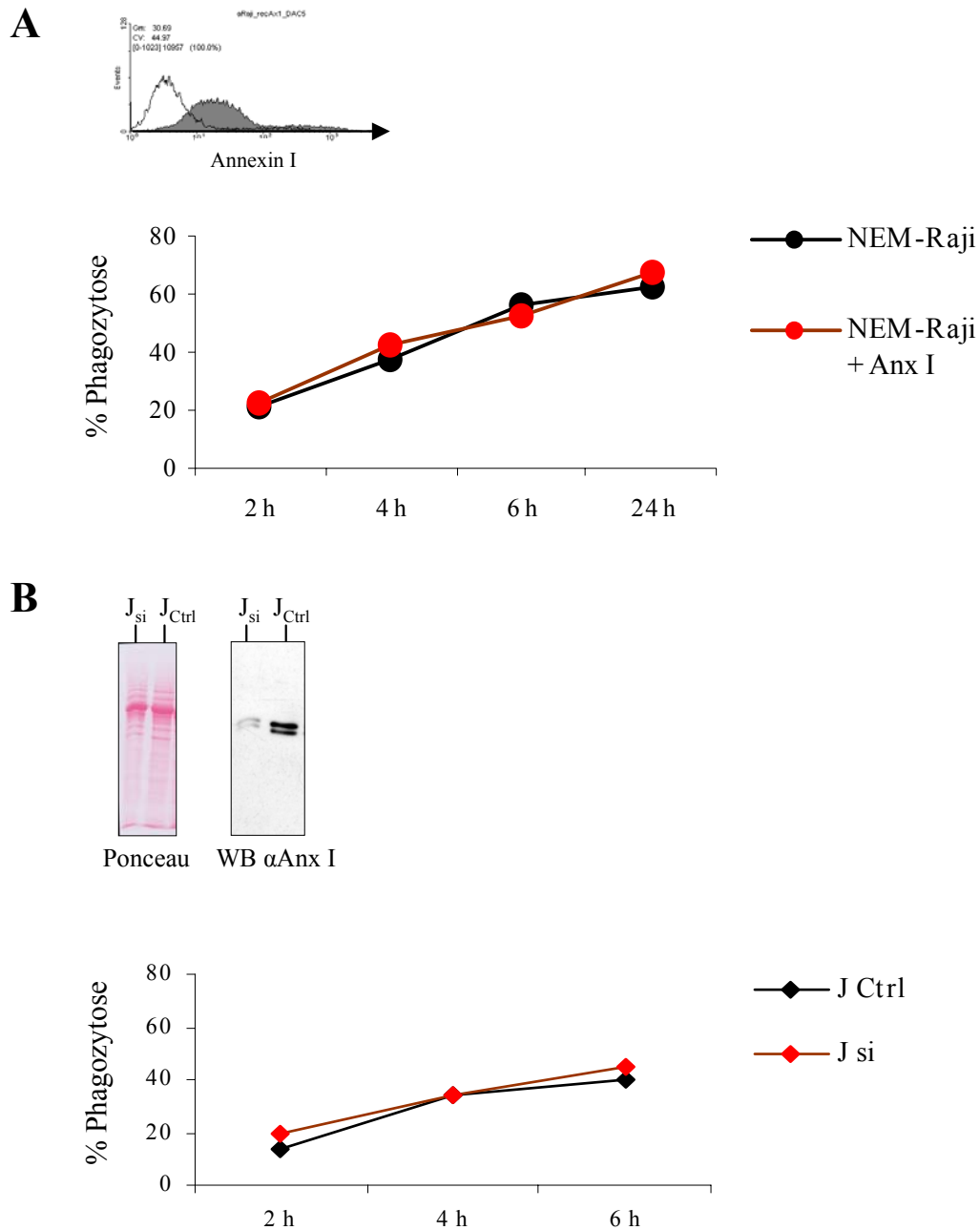


**Abb. III.7: Nachweis von Annexin I auf der Oberfläche von apoptotischen Thymozyten *ex vivo*.** Humane Thymozyten aus frischem Thymusgewebe wurden mit Antikörpern gegen CD8, CD4 sowie mit DAC5 und Annexin V (A,B) bzw. mit DAC5 und Antikörpern gegen CD3 und CD95 (C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. A, Darstellung der Annexin I- und Phosphatidylserin-positiven Zellen im Histogramm. B, Darstellung der CD4- und CD8-Expression der gesamten Thymozyten (links) sowie der Annexin I-positiven Thymozyten (Anx I<sup>+</sup>) in Relation zur Expression von CD4 und CD8 (rechts). C, Darstellung der CD3- und CD95-Expression der Thymozyten. Abhängig von ihrer CD3- und CD95-Expression wurden die Zellen in die Regionen R1 = geringe CD3-Expression, R2 = intermediäre CD3- und hohe CD95-Expression und R3 = hohe CD3- und geringe CD95-Expression eingeteilt (links). Der Anteil Annexin I-positiver Zellen in den Regionen ist rechts dargestellt.

### 2.7 Annexin I beeinflusst die Phagozytose apoptotischer Zellen nicht

Der Untersuchung von Arur *et.al.* zufolge spielt Annexin I auf apoptotischen Zellen eine Rolle bei der Aufnahme dieser Zellen durch Phagozyten (Arur et al. 2003). Daher wurde der Einfluss von rekombinantem Annexin I beziehungsweise die Wirkung des Antikörpers DAC5 auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen untersucht. Da Raji-Zellen kein endogenes Annexin I besitzen (Tab. III.1.1 und (Morand et al. 1995)), konnte mit Hilfe dieser Zellen der Einfluss von rekombinantem Annexin I auf die Phagozytose untersucht werden. Dazu wurde in fluoreszenzmarkierten Raji-Zellen durch Inkubation mit NEM die Externalisierung von Phosphatidylserin ausgelöst. Nach Inkubation mit rekombinantem Annexin I konnte das Protein auf der Oberfläche von Phosphatidylserin-positiven Raji-Zellen mit DAC5 nachgewiesen werden (Abb. III.8A). Anschließend wurden die Raji-Zellen zu differenzierten U-937-Zellen gegeben und die Phagozytose durch Messung der Fluoreszenz der U-937-Zellen bestimmt. Nach verschiedenen Zeitpunkten zeigte die Phagozytose von Kontrollzellen ohne Annexin I und die Phagozytose der Annexin I-beladenen Zellen keine Unterschiede, sodass in diesem Experiment kein Einfluss von Annexin I auf die Phagozytose nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich wurde in Jurkat T-Zellen die Expression von endogenem Annexin I durch Transfektion mit einer gegen Annexin I gerichteten siRNA verringert (Abb. III.8B). Nach Induktion von Apoptose durch UV-Bestrahlung zeigte auch die Phagozytose dieser apoptotischen Jurkat T-Zellen zeigte keinen Unterschied zur Phagozytose von vektortransfizierten Kontrollzellen und erwies sich somit als weitgehend unabhängig von endogenem Annexin I (Abb. III.8C). Insgesamt konnte daher eine Rolle von Annexin I bei der Phagozytose apoptotischer Zellen in diesem System nicht bestätigt werden.



**Abb. III.8: Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen.** A, Rekombinantes Annexin I wurde auf NEM-behandelte Raji-Zellen gegeben und auf der Oberfläche der Zellen mit DAC5 im Durchflusszytometer nachgewiesen (Histogramm). Fluoreszenzmarkierte, NEM-behandelte Raji-Zellen (NEM-Raji) und Annexin-I-beladene Raji-Zellen (NEM-Raji + Anx I) wurden anschließend mit differenzierten U-937-Zellen kultiviert. Die Phagozytose wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Messung der Fluoreszenz der U-937-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. B, In Jurkat T-Zellen wurde die endogene Expression von Annexin I durch Transfektion mit siRNA vermindert. Die reduzierte Annexin I-Expression von siRNA-transfizierten Zellen ( $J_{si}$ ) im Vergleich zu vektortransfizierten Kontrollzellen ( $J_{Ctrl}$ ) wurde im Westernblot mit DAC5 nachgewiesen. In fluoreszenzmarkierten  $J_{si}$ - und  $J_{Ctrl}$ -Zellen wurde Apoptose durch UV-C-Bestrahlung ausgelöst und die Phagozytose wie unter (A) nach den angegebenen Zeiten bestimmt.

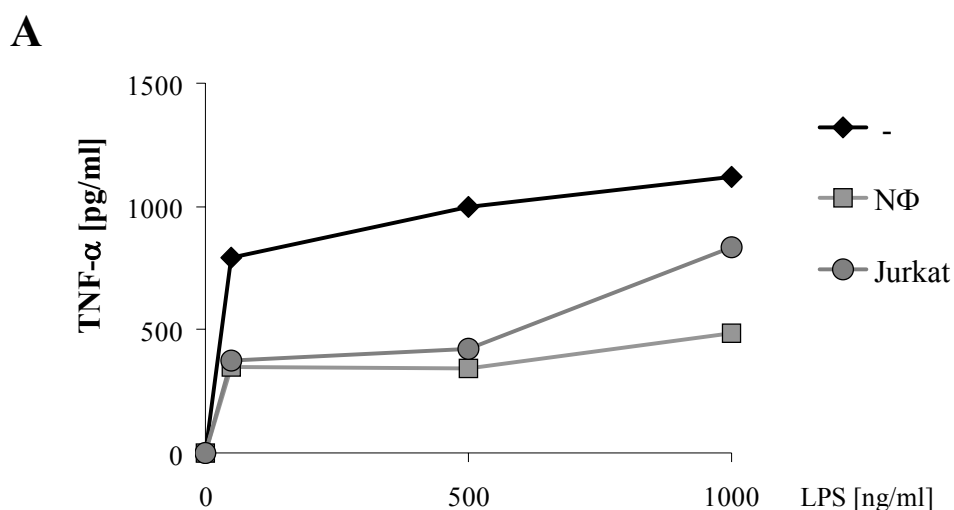
### *3. Die Rolle von Annexin I auf apoptotischen Zellen in der Immunantwort*

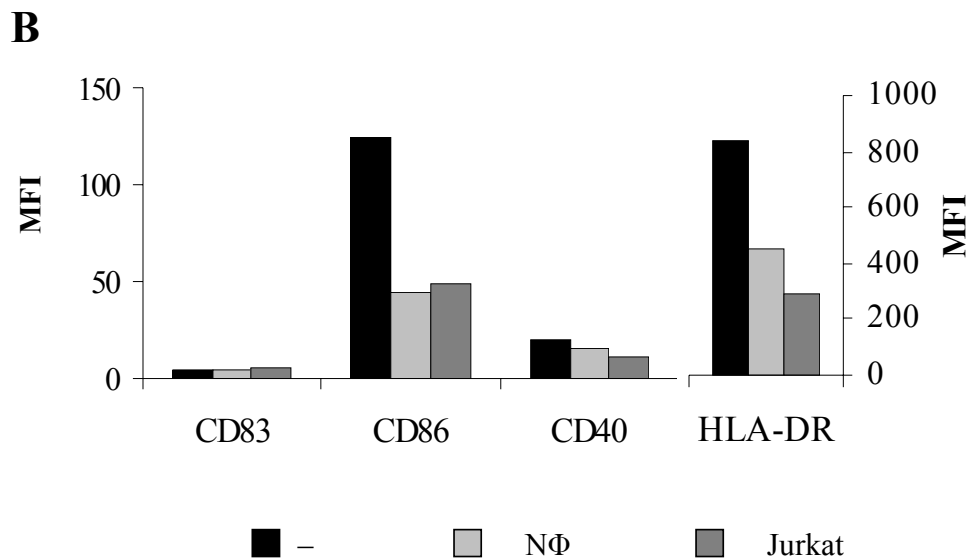
Eine Funktion von Annexin I in Verbindung mit dem Immunsystem wurde zunächst im Rahmen der immunsuppressiven Wirkungen von Glucocorticoiden beschrieben (Flower & Rothwell 1994). Zusätzlich konnte eine anti-inflammatorische Wirkung des Proteins auch extrazellulär nachgewiesen werden. In verschiedenen Tiermodellen inhibiert die Applikation von Annexin I beziehungsweise N-terminaler Peptide des Proteins die Migration und Diapedese von Leukozyten in entzündetes Gewebe (Yang et al. 1999; D'Amico et al. 2000; Gavins et al. 2003; Moreno 1996). Diese Effekte beziehen sich in erster Linie auf injizierte, lösliche Proteinpräparationen oder Peptide im Rahmen einer induzierten Entzündungsreaktion. Extrazelluläres, endogenes Annexin I tritt aber unter physiologischen Bedingungen vor allem zellgebunden auf der Oberfläche apoptotischer Zellen auf (zum Beispiel bei der Apoptose von Neutrophilen, Abb. III.4). Die beschriebenen anti-inflammatorischen Eigenschaften von Annexin I in Verbindung mit dem Auftreten des Proteins auf frühapoptotischen Zellen lassen daher vermuten, dass der anti-inflammatorische Effekt apoptotischer Zellen (Savill et al. 2002; Liu et al. 2002a) zumindest teilweise von Annexin I vermittelt wird. Deshalb wurde die Rolle des Proteins bei der Interaktion von apoptotischen Zellen mit Zellen des Immunsystems, insbesondere mit dendritischen Zellen, weiter untersucht.

#### **3.1. Apoptotische Zellen inhibieren die Reifung dendritischer Zellen**

Um die Wirkung apoptotischer Zellen auf dendritische Zellen zu untersuchen, wurden Kokulturen von unreifen dendritischen Zellen mit apoptotischen Neutrophilen beziehungsweise apoptotischen, UV-bestrahlten Jurkat T-Zellen durchgeführt. Nach vierstündiger Inkubation der dendritischen Zellen mit den apoptotischen Zellen war bereits ein großer Teil der apoptotischen Zellen aufgenommen (Daten nicht gezeigt). Zur Reifung und Aktivierung der dendritischen Zellen wurde daraufhin bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) zu den Kokulturen gegeben. LPS bindet an den Toll-Like-Rezeptor (TLR) 4 (Janeway, Jr. & Medzhitov 2002; Beutler 2005). Dies führt unter anderem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie zu einer verstärkten Expression der

kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie und der MHC-Klasse II-Moleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zellen. Dadurch sind die reifen dendritischen Zellen in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren und eine Immunantwort auszulösen. Um die Aktivierung und Reifung der dendritischen Zellen zu messen, wurde die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) bestimmt und die Oberflächen-Expression der Moleküle CD40, CD83, B7.2 (CD86) und MHC-Klasse II (HLA-DR) im Durchflusszytometer analysiert. Während unreife dendritische Zellen kein TNF- $\alpha$  sekretieren und nur wenige kostimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche tragen, zeigte sich nach LPS-Stimulation eine hohe TNF- $\alpha$ -Sekretion sowie eine starke Expression der Moleküle CD86 und MHC-Klasse II (Abb. III.9A und B). Bei dendritischen Zellen, die mit apoptotischen Zellen kokultiviert wurden, wurde hingegen nach dem gleichen Stimulus eine um bis zu zwei Drittel verminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion nachgewiesen. Auch die Oberflächenexpression der Moleküle CD86 und MHC-Klasse II war stark reduziert, während die Expression der Moleküle CD40 und CD83 nicht beeinflusst wurde. Diese Experimente belegen, dass der Einfluss apoptotischer Zellen zu einer Inhibition der LPS-induzierten Reifung der dendritischen Zellen führt und damit die Entwicklung immunstimulatorischer dendritischer Zellen hemmt.





**Abb. III.9: Apoptotische Zellen inhibieren die Reifung von dendritischen Zellen.** Humane unreife dendritische Zellen wurden alleine (-) oder zusammen mit apoptotischen Neutrophilen (NΦ) bzw. apoptotischen Jurkat T-Zellen (Jurkat) für 4 h kultiviert. Anschließend wurde LPS in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und nach 16 h die Konzentration an TNF- $\alpha$  in den Überständen bestimmt (A). Nach 48 h wurde die Oberflächen-Expression der Moleküle CD40, CD83, CD86 und HLA-DR mit spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer bestimmt (B). Bei diesem Experiment wurden 500 ng/ml LPS eingesetzt.

### 3.2 Annexin I inhibiert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

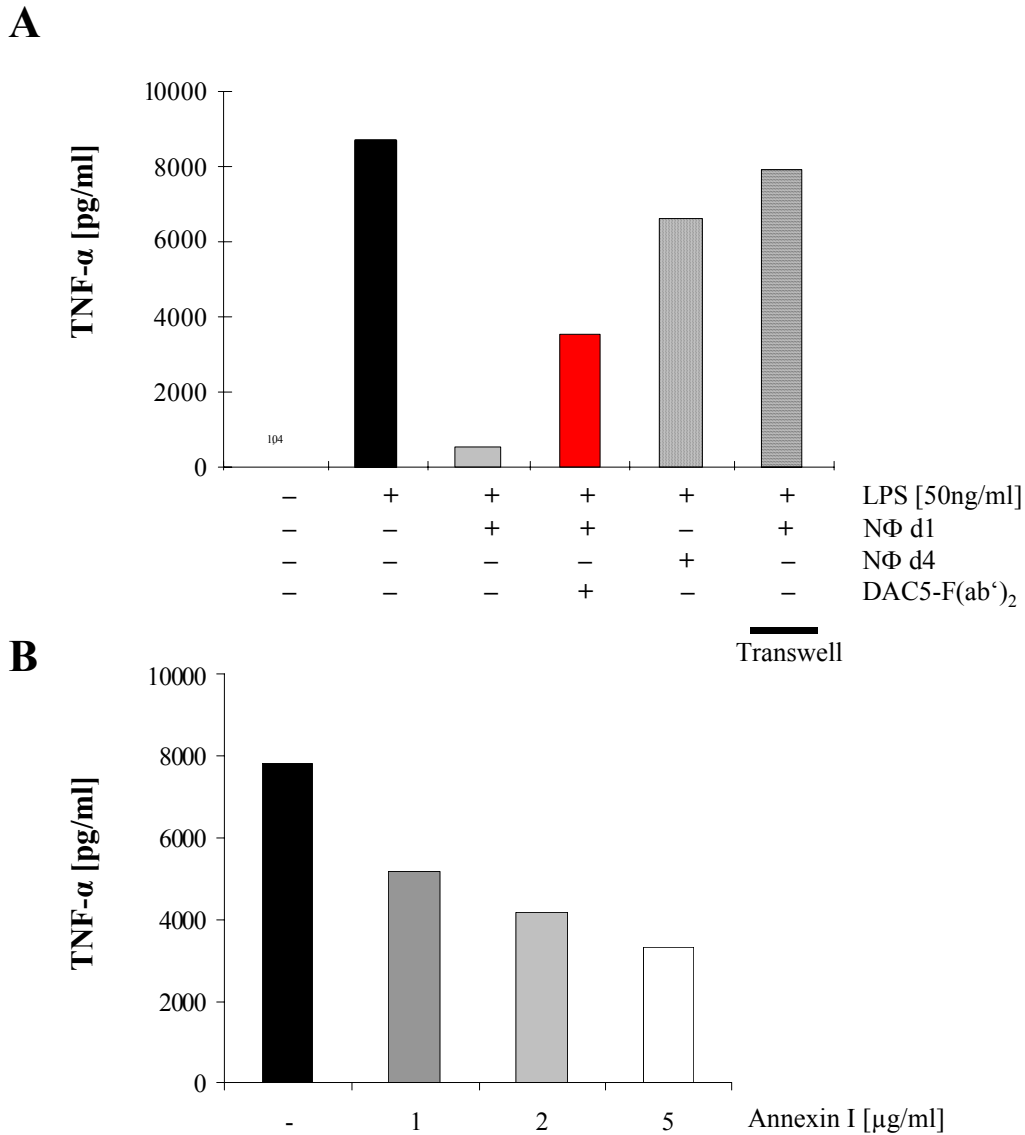
Um den inhibitorischen Einfluss apoptotischer Zellen und insbesondere die Rolle von Annexin I auf der Oberfläche der Zellen näher zu untersuchen, wurden verschiedene Kokultur-Experimente durchgeführt (Abb. III.10A). In einem Transwell-Experiment wurde zunächst getestet, ob die Inhibition durch apoptotische Neutrophile von einem direkten Kontakt mit den dendritischen Zellen abhängig ist. Dabei wurden die apoptotischen Neutrophilen von den dendritischen Zellen durch eine Membran getrennt, sodass lösliche Faktoren die dendritischen Zellen erreichen konnten, aber kein Zell-Zell-Kontakt und keine Phagozytose möglich war. In diesem Fall konnten die apoptotischen Neutrophilen die TNF- $\alpha$ -Sekretion der dendritischen Zellen nicht inhibieren. Daher scheint der inhibitorische Effekt apoptotischer Zellen Zellkontakt-abhängig zu sein. Weiterhin wurde der Einfluss spät-apoptotischer Neutrophiler

untersucht, die zuvor vier Tage *in vitro* kultiviert wurden. Diese spät-apoptotischen Zellen konnten die TNF- $\alpha$ -Sekretion ebenfalls nicht unterdrücken. Die Inhibition dendritischer Zellen ist demnach auf früh-apoptotische Zellen beschränkt.

Die suppressive Wirkung apoptotischer Zellen auf dendritische Zellen ist den vorgenannten Experimenten zufolge auf ein zellgebundenes Molekül von früh-apoptotischen Zellen zurückzuführen. Diese Kriterien stimmen sehr gut mit dem Verlauf der Annexin I-Exposition überein, da das Protein nicht in löslicher Form sondern zellgebunden und früh im Verlauf der Apoptose auf der Oberfläche exponiert wird (Abb. III.3 und III.4). Zudem ist Annexin I auf spätapoptotischen Zellen fast vollständig abgebaut (Abb. III.5). Daher wurde die Rolle des Oberflächen-Annexin I von apoptotischen Neutrophilen in diesem System durch eine Vorinkubation der apoptotischen Zellen mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten von DAC5 weiter untersucht. Die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente sollten das exponierte Annexin I auf den früh-apoptotischen Neutrophilen blockieren. Zusätzlich konnte durch Verwendung der F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente ein Effekt des F<sub>c</sub>-Teils von DAC5 auf F<sub>c</sub>-Rezeptoren der dendritischen Zellen ausgeschlossen werden. Nach Vorinkubation mit den DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten wurden die apoptotischen Neutrophilen wiederum vier Stunden zusammen mit unreifen dendritischen Zellen kultiviert, bevor zur Reifung der dendritischen Zellen LPS zugegeben wurde. Es zeigte sich, dass die Blockierung von Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Neutrophiler die Inhibition der TNF- $\alpha$ -Sekretion zu einem beträchtlichen Teil wieder aufheben konnte (Abb. III.10A). Damit belegen die Ergebnisse der Inhibitions-Studien mit dem DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment einen direkten Einfluss von Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen.

Neben dem Signal von Annexin I werden die dendritischen Zellen durch apoptotische Neutrophile in vielerlei Hinsicht zusätzlich beeinflusst. Insbesondere können anti-inflammatorische Signale der Zellen durch das Auftreten pro-inflammatorischer Moleküle wie Harnsäure oder oxidierten Lipide wieder aufgehoben werden (Shi et al. 2003; Chang et al. 2004). Um das Annexin I-Signal isoliert und unabhängig von den übrigen Signalen apoptotischer Zellen untersuchen zu können, wurde der Einfluss von humanem, rekombinanten Annexin I analysiert (Abb. III.10B). Ähnlich wie nach Inkubation mit apoptotischen Zellen konnte auch durch die Zugabe von rekombinanten Annexin I die TNF- $\alpha$ -Sekretion von dendritischen Zellen dosisabhängig um bis zu 50 Prozent inhibiert werden. Zusammen demonstrieren die Ergebnisse der Inhibitions-Studien mit DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten und die

Suppression dendritischer Zellen durch rekombinantes Annexin I eine bedeutende Rolle des Proteins als inhibitorisches Signal auf der Oberfläche apoptotischer Zellen.



**Abb. III.10: Annexin I inhibiert die TNF- $\alpha$ -Sekretion dendritischer Zellen.** A, Früh-apoptotische Neutrophile (NΦ d1) wurden unbehandelt oder nach Inkubation mit 10  $\mu$ g/ml DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zusammen mit unreifen dendritischen Zellen für 4 h kultiviert. Zur Kontrolle wurden die früh-apoptotischen Neutrophilen durch eine Membran von den dendritischen Zellen getrennt (Transwell). Zusätzlich wurden spät-apoptotische Neutrophile (NΦ d4) eingesetzt. Anschließend wurde zu den angegebenen Proben jeweils 50 ng/ml LPS gegeben und die Konzentration von TNF- $\alpha$  in den Zellkultur-Überständen nach weiteren 16 h im ELISA bestimmt. B, Humane unreife dendritische Zellen wurden für 4 h mit den angegebenen Konzentrationen an löslichem Annexin I inkubiert und anschließend mit 500 ng/ml LPS behandelt. Nach 16 h wurde die Konzentration an TNF- $\alpha$  in den Zellkultur-Überständen im ELISA bestimmt.

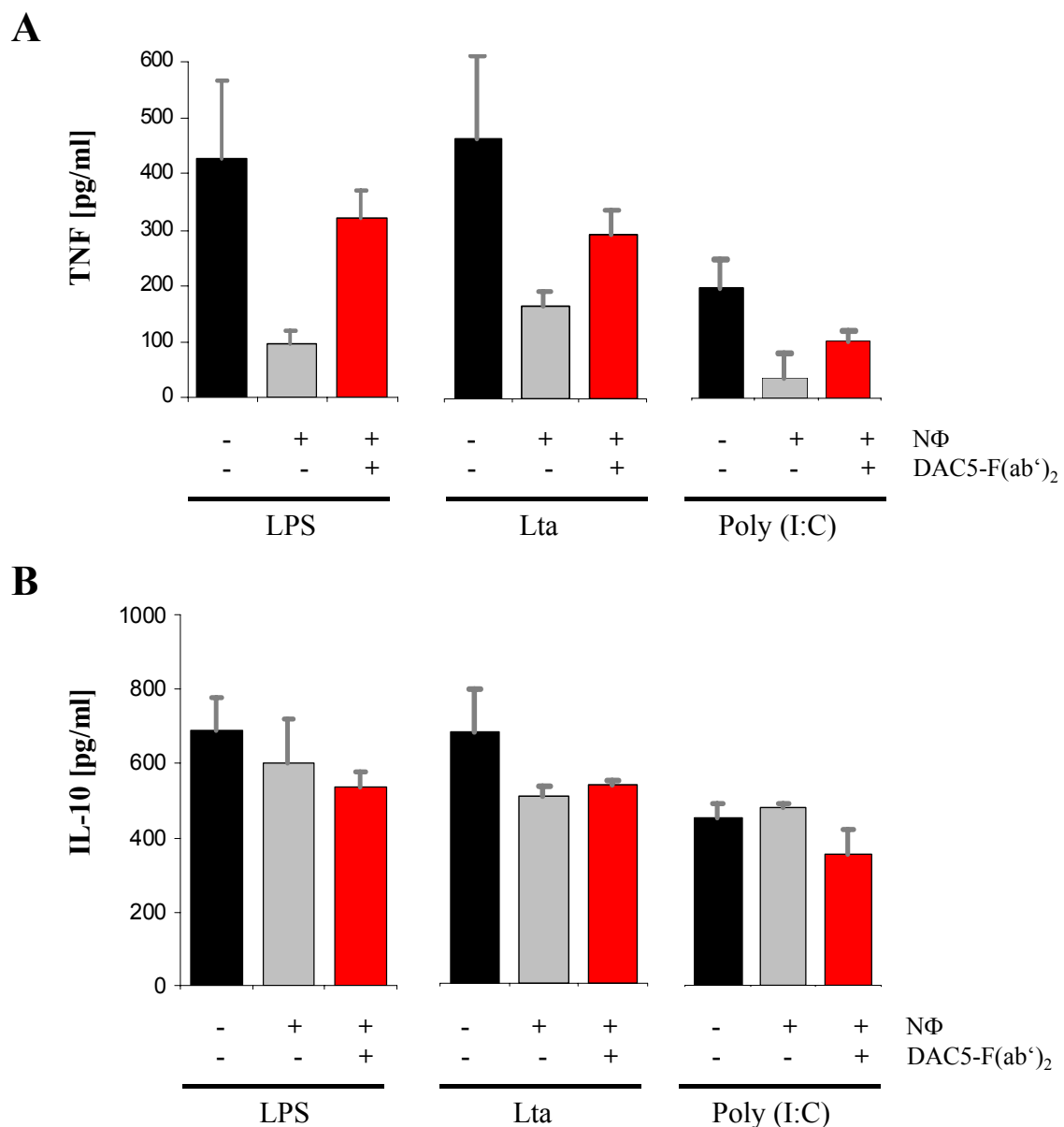


### 3.3 Der inhibitorische Effekt von Annexin I ist unabhängig von der Art des Toll Like Rezeptor Stimulus

Um den Einfluss apoptotischer Zellen auf die Reifung dendritischer Zellen nachzuweisen, wurden die dendritischen Zellen in der Regel mit bakteriellem LPS stimuliert. LPS bindet an TLR4, dessen Signalweiterleitung über die Adaptermoleküle MyD88 und TRIF verläuft (Beutler 2004). Neben dem Rezeptor für LPS sind bisher neun weitere TLRs in Säugetieren beschrieben, die jeweils an repetitive Strukturen unterschiedlicher Erreger binden, zum Beispiel an virale doppelsträngige RNA (TLR3) und an Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien (TLR2) (Barton & Medzhitov 2002). Im Gegensatz zu TLR4 erfolgt die Signalweiterleitung vieler TLRs jedoch entweder nur über das Molekül MyD88 (TLRs 1,2,5,7,8,9,11) oder nur über das Molekül TRIF (TLR3). Um zu untersuchen, ob die Hemmung des TLR-Signales durch apoptotische Zellen auf ein bestimmtes TLR-Signal beschränkt ist oder aber Signale verschiedener TLRs inhibiert werden können, wurden neben LPS zusätzlich Lipoteichonsäure (Lta) und das synthetische Homopolymer Polyinosin-Polycytidin-Säure (Poly(I:C)), ein synthetisches Analogon für doppelsträngige virale DNA, eingesetzt. Während Lipoteichonsäure TLR3 und damit einen TRIF-abhängigen Signalweg aktiviert, bindet Poly(I:C) an den TLR2, dessen Signalweg über MyD88 läuft.

Als Modellsystem für primäre dendritische Zellen wurde in diesem Experiment die monozytische Zelllinie U-937 eingesetzt. Nach Differenzierung mit Phorbolestern sind diese Zellen adhärent und sekretieren TNF- $\alpha$  nach Stimulation durch LPS, Lta und Poly(I:C) (Abb. III.11A). Auch im Fall der U-937-Zellen konnte die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion durch die Kokultur mit apoptotischen Neutrophilen deutlich inhibiert werden. Die Inhibition wurde bei Blockierung von Annexin I durch DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente wiederum größtenteils aufgehoben, sodass die Ergebnisse aus den Experimenten mit primären dendritischen Zellen in diesem Modellsystem reproduziert werden konnten. Auch bei Stimulation mit den Liganden von TLR2 und TLR3 zeigte sich eine Annexin I-abhängige Inhibition der TNF- $\alpha$ -Sekretion. Somit scheint das Annexin I-Signal den Reifungsstimulus nicht auf Ebene des jeweiligen TLR zu inhibieren, sondern weiter abwärts in der Signalkette. Um Einfluss von Annexin I auf die Signalwege der TLRs weiter zu untersuchen, sollten in Zukunft noch weitere TLR-Liganden in die Analyse einbezogen werden.

Zusätzlich wurde in diesem Experiment die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 gemessen. Die Sekretion von Interleukin-10 wurde durch die TLR-Liganden deutlich induziert (Daten nicht gezeigt), aber im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  konnte die Sekretion von Interleukin-10 durch apoptotische Zellen nicht beeinflusst werden (Abb. III.11B). Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen scheint demnach eine spezifische Inhibition pro-inflammatorischer Zytokine zu bewirken, die sich nicht auf andere, anti-inflammatorische Zytokine erstreckt.



**Abb. III.11: Die Wirkung von Annexin I ist unabhängig von der Art des TLR-Stimulus.** Differenzierte U-937-Zellen wurden für 4 h mit apoptotischen Neutrophilen (N $\Phi$ ) kokultiviert und anschließend mit den angegebenen TLR-Liganden stimuliert. Nach 24 h wurden TNF- $\alpha$  (A) und Interleukin-10 (IL-10, B) in den Zellkultur-Überständen mittels ELISA analysiert.

### 3.4 Annexin I auf apoptotischen Zellen beeinflusst die T-Zell-Stimulation

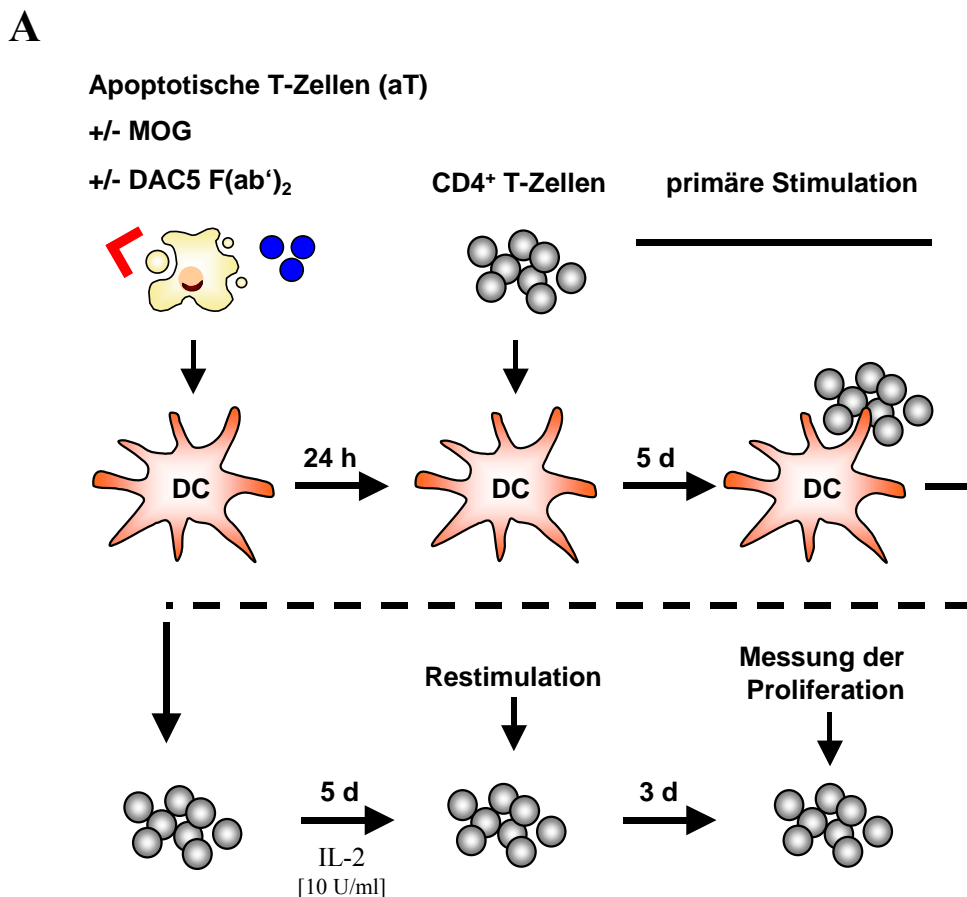
Als besonders effektive antigenpräsentierende Zellen können dendritische Zellen die Initiation und den Verlauf einer Immunantwort entscheidend beeinflussen. Treffen naive T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen auf dendritische Zellen, so hängt die weitere Entwicklung der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung vor allem von der Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und sekretierter Zytokine der dendritischen Zellen ab (Banchereau et al. 2000; Mahnke et al. 2002). Mithin bestimmt der Phänotyp der dendritischen Zellen, ob T-Zellen weiter zu Effektorzellen und Trägern einer Immunantwort differenzieren oder aber als anerge beziehungsweise regulatorische T-Zellen zur Toleranz des Organismus beitragen.

In den Kokultur-Experimenten wurde die LPS-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle dendritischer Zellen durch apoptotische Zellen inhibiert. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Inhibition auch funktionelle Konsequenzen auf Ebene der T-Zell-Stimulation hat.

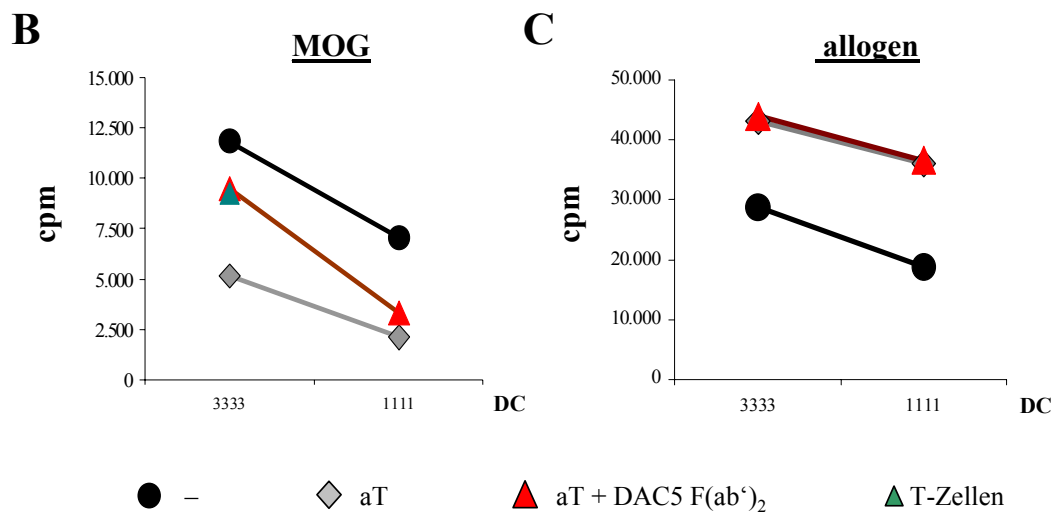
Aufgrund von Problemen bei der Kultivierung primärer dendritischer Zellen (siehe IV. 2.1) konnten in diesem Fall nur vorläufige Daten gewonnen werden. Die Inkubation dendritischer Zellen mit apoptotischen Zellen in einem syngenen T-Zell-Stimulationsexperiment mit dem Modellantigen Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) ergab aber Hinweise auf einen Einfluss von Annexin I bei der T-Zell-Stimulation durch dendritische Zellen. Dazu wurden unreife dendritische Zellen zunächst mit MOG und apoptotischen T-Zellen für 24 h kokultiviert. Daraufhin wurden zu den Kokulturen syngene T-Zellen im Verhältnis 1:10 (DC:T-Zellen) zugegeben. Nach einer fünftägigen Proliferationsperiode – der primären Stimulation – wurden die T-Zellen gewaschen und für weitere fünf Tage mit einer geringen Konzentration von Interleukin-2 (10 Units/ml) in Kultur gehalten. Zuletzt wurden die T-Zellen mit reifen syngenen dendritischen Zellen und dem Modellantigen für drei Tage restimuliert. Zur Kontrolle erfolgte die Restimulation mit reifen allogenen dendritischen Zellen. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch Markierung der Zellen mit radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin und Messung im Gamma-Zähler bestimmt (siehe Abb. III.12A).

Die antigenspezifische Restimulation zeigte, dass die primäre Stimulation mit dendritischen Zellen zu einer hohen Proliferation der T-Zellen führte (Abb. III.12B).

Dendritische Zellen, die zuvor mit apoptotischen Zellen inkubiert worden waren, konnten die T-Zellen hingegen nicht optimal stimulieren. Die antigenspezifische Proliferation der T-Zellen wurde sogar durch diese dendritischen Zellen inhibiert, da die T-Zellen in geringerem Maße proliferierten als naive T-Zellen, die für zehn Tage ohne Stimulation kultiviert worden waren. Um zu testen, ob dieser suppressive Effekt auf die T-Zell-Stimulation von Annexin I abhängig ist, wurden die apoptotischen T-Zellen wiederum mit DAC5 F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten vorinkubiert. Tatsächlich konnte durch diese Blockierung des Annexin I-Signals der suppressive Effekt der apoptotischen Zellen teilweise wieder aufgehoben werden.



**Abb. III.12 A: Annexin I inhibiert die Stimulation naiver T-Zellen.** Schema des Versuchsablaufs von Abb. III.12B, Einzelheiten siehe Text.



**Abb. III.12 A: Annexin I inhibiert die Stimulation naiver T-Zellen.** Unreife dendritische Zellen (–) wurden mit MOG sowie mit apoptotischen T-Zellen (aT) oder apoptotischen T-Zellen und DAC5 F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten (aT + DAC5 F(ab')<sub>2</sub>) für 24 h kokultiviert. Für die antigenabhängige Stimulation wurden darauf syngene T-Zellen zu den Kokulturen gegeben. Zur Kontrolle wurden T-Zellen ohne dendritische Zellen kultiviert (T-Zellen). Nach 5 Tagen wurden die T-Zellen gewaschen und weitere 5 Tage allein kultiviert. Nach Restimulation mit syngenen, reifen dendritischen Zellen und MOG wurde die antigenabhängige Proliferation der T-Zellen durch Markierung mit <sup>3</sup>H-Thymidin im Gamma-Zähler gemessen (B). Zusätzlich wurden die T-Zellen mit allogeenen dendritischen Zellen restimuliert (C). Die Angaben der X-Achse beziehen sich auf die Anzahl der eingesetzten dendritischen Zellen (DC) je 50.000 T-Zellen.

Der inhibierende Effekt apoptotischer Zellen zeigte sich zudem abhängig von dem Modellantigen MOG, da die Inhibition bei einer allogeenen Restimulation der gleichen T-Zellen nicht zu beobachten war (Abb. III.12B). Im Vergleich mit T-Zellen, die mit dendritischen Zellen allein stimuliert worden waren, führte die Restimulation mit allogeenen dendritischen Zellen sogar zu einer höheren Proliferation der T-Zellen. Die Vorinkubation mit DAC5 F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf die Proliferation. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen nicht nur zu einer verminderten Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt, sondern dass sich der inhibitorische Einfluss von Annexin I auch auf die Fähigkeit zur antigenspezifischen Stimulation von naiven T-Zellen erstreckt.

## **IV. Diskussion**

Apoptose ist der physiologische Zelltod zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und zur Beseitigung überzähliger und potentiell gefährlicher Zellen. Die Aufnahme apoptotischer Zellen erfolgt größtenteils durch professionelle Phagozyten wie Makrophagen und dendritische Zellen (Parnaik et al. 2000). Diese Zellen können zugleich als professionelle antigenpräsentierende Zellen besonders effektiv Immunantworten gegen aufgenommene Antigene auslösen, daher ist die Unterdrückung einer solchen Immunantwort gegen die Autoantigene aus apoptotischen Zellen von essentieller Bedeutung für den Organismus. Tatsächlich konnte in vielen Untersuchungen eine suppressive Wirkung apoptotischer Zellen auf das Immunsystem nachgewiesen werden (Hugues et al. 2002; Ferguson et al. 2002; Stuart et al. 2002; Liu et al. 2002a).

Die molekulare Grundlage dieser suppressiven Wirkung ist jedoch noch unklar, da mit Ausnahme von Phosphatidylserin bisher kein anti-inflammatorisches Molekül im Zusammenhang mit apoptotischen Zellen beschrieben wurde (Huynh et al. 2002). Die Charakterisierung des anti-inflammatorischen Effektes apoptotischer Zellen auf molekularer Ebene ist daher von außerordentlicher Bedeutung für die Erforschung der immunologischen Toleranzmechanismen gegen eigenes Gewebe und könnte die Entwicklung von Strategien zur effektiven Tumorbekämpfung und zur Organtransplantation unterstützen. Mit Hilfe eines neuen monoklonalen Antikörpers, DAC5, konnte in dieser Arbeit die Exposition von Annexin I auf der Oberfläche früh-apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Ferner wurde Annexin I als wichtiges Signalmolekül apoptotischer Zellen bei der Vermittlung eines anti-inflammatorischen Effektes auf dendritische Zellen identifiziert. Der Annexin I-abhängige Einfluss auf dendritische Zellen umfasste das Zytokinprofil, kostimulatorische Oberflächenmoleküle und die Kapazität zur T-Zell-Stimulation und führte zu einem tolerogenen Phänotyp der dendritischen Zellen.

### 1. *Annexin I wird auf der Oberfläche apoptotischer Zellen präsentiert*

#### 1.1 **Annexin I ist ein Kennzeichen frühapoptotischer Zellen**

Durch Immunisierung von Mäusen mit apoptotischen Zellen konnte ein monoklonaler Antikörper gewonnen werden, der spezifisch gegen die Oberfläche frühapoptotischer Zellen gerichtet ist (Abb. III.1). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte auf der Oberfläche apoptotischer Zellen ein Molekül – Annexin I – identifiziert werden (Abb. III.2), das dort bisher noch nicht beschrieben wurde. Annexin I ist in lebenden Zellen intrazellulär lokalisiert und wird nach Induktion der Apoptose auf die äußere Seite der noch intakten Zellmembran transportiert ((Wallner et al. 1986) und Abb. III.3). Im Vergleich mit gut charakterisierten Parametern der Apoptose zeigte sich, dass Annexin I bereits in der frühen Phase der Apoptose auf der äußeren Membran detektiert werden kann, deutlich bevor die DNA gespalten wird und die Membranintegrität der Zelle zusammenbricht (Abb. III.1 und III.4). Der Verlauf der Annexin I-Exposition folgt dabei der Externalisierung von Phosphatidylserin, das ebenfalls als frühes Kennzeichen der Apoptose beschrieben wurde (Verhoven et al. 1995).

Diese frühe Exposition unterscheidet Annexin I von vielen anderen apoptotischen Oberflächenveränderungen, zum Beispiel von dem Auftreten einer apoptose-spezifischen Form des Moleküls ICAM-3 wie auch von der Exposition oxidierter Lipide und veränderter Zuckerstrukturen (Moffatt et al. 1999; Chang et al. 1999; Azuma et al. 2002). Alle genannten Modifizierungen treten erst in einer späten Phase der Apoptose auf. Da die Phagozytose apoptotischer Zellen *in vivo* aber in einem frühen Stadium der Apoptose erfolgt (Surh & Sprent 1994; Savill et al. 1993), sind nur früh-apoptotische Signale wie die Exposition von Annexin I in der Lage, ein Signal apoptotischer Zellen unter physiologischen Gleichgewichtsbedingungen – im *steady-state* – zu vermitteln. Spät-apoptotische Signale haben hingegen möglicherweise eine Bedeutung bei der verzögerten Phagozytose apoptotischer Zellen, wie beim systemischen Lupus erythematodes beschrieben (Licht et al. 2004). Apoptose kann unter physiologischen Bedingungen durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli ausgelöst werden, unter anderem durch den externen CD95-Signalweg und interne Signalwege mit Beteiligung der Mitochondrien (Scaffidi et al.

1999a). Daher wurde die Exposition von Annexin I-Signal nach verschiedenen apoptotischen Stimuli untersucht. Die Externalisierung von Annexin I erfolgte bei allen untersuchten Bedingungen unabhängig vom Apoptose-Stimulus, sowohl bei Auslösung des externen Apoptosesignalwegs nach Aktivierung des CD95-Rezeptors (APO-1/Fas) als auch bei Beteiligung des internen Signalweges nach Staurosporin-Behandlung und UV-C-Bestrahlung (Abb. III.4C). Somit stellt die Exposition von Annexin I offenbar ein allgemeines Merkmal apoptotischer Zellen dar – sofern das Protein in den betreffenden apoptotischen Zellen exprimiert wird und zusätzlich negativ geladene Lipide wie Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Zellen als Bindungsstellen zur Verfügung stehen (Tab. III.1). Die Externalisierung von Phosphatidylserin ist jedoch ein generelles Kennzeichen apoptotischer Zellen, da dieses Phänomen für viele unterschiedliche Zelltypen beschrieben wurde und zudem phylogenetisch konserviert ist (Schlegel & Williamson 2001; van den Eijnde et al. 1998).

Hinsichtlich der Expression von Annexin I gibt es Hinweise, dass auch Zellen mit geringer Annexin I-Expression das Protein auf verschiedene Signale hin stärker exprimieren können (Kang et al. 1996; Miyachi et al. 2001). Ein gutes Beispiel dafür sind T-Zellen, die als naive, unstimulierte Zellen weitgehend apoptoseresistent sind und wenig Annexin I exprimieren (Morand et al. 1995). Nach Aktivierung durch Mitogene entwickeln sich die T-Zellen innerhalb einiger Tage zu reifen Effektorzellen (Klas et al. 1993). In dieser Aktivierungsphase werden sie einerseits sensitiv gegenüber Apoptose auslösenden Stimuli (Schmitz et al. 2004), andererseits wird die Expression von Annexin I stark gesteigert (persönliche Kommunikation Dirk Brenner). Demnach zeigen die meisten apoptotischen T-Zellen in der Peripherie offenbar eine hohe Expression von Annexin I. Auch die sehr hohe Annexin I-Expression von Neutrophilen (Perretti & Flower 2004) korreliert mit einer außergewöhnlich hohen Apoptoserate dieser Zellen im Körper. Neutrophile stellen mit einem Anteil von 70 bis 80 Prozent der Leukozyten die größte kernhaltige Zellpopulation im Blut dar (Stowe et al. 1999). Da sie nur eine kurze Lebenszeit von wenigen Stunden besitzen (Bicknell et al. 1994), tritt im *steady state* eine große Anzahl von apoptotischen Neutrophilen auf. In anderen Gewebe wie zum Beispiel der Haut nimmt die Expression von Annexin I im Verlauf der terminalen Differenzierung zu (Dreier et al. 1998; Guzman-Aranguez et al. 2005) oder kann, wie bei Hepatozyten, nach einer Verletzung induziert werden (de Coupade et al. 2000).



Demnach scheint eine starke Expression von Annexin I bevorzugt in denjenigen Zellen aufzutreten, in denen unter den Bedingungen der Gewebehomöostase bevorzugt Apoptose auftritt. Durch die beschriebene konstitutive beziehungsweise induzierbare Annexin I-Expression vieler Gewebe könnte sichergestellt werden, dass das Auftreten apoptotischer Zellen in der Regel durch ein anti-inflammatorisches Signal in Form der Externalisierung von Annexin I begleitet wird.

Bei der Untersuchung kalziumabhängig gebundener Proteine auf der Oberfläche apoptotischer Zellen konnte neben Annexin I auch die Externalisierung weiterer Proteine der Annexin-Familie nachgewiesen werden (Abb. III.3). Obwohl eine spezifische Funktion der Annexine in den meisten Untersuchungen den einzigartigen N-Termini der Proteine zugeschrieben wird (Perretti et al. 1995; Gerke & Moss 2002), impliziert die Externalisierung weiterer Annexine im Zusammenhang mit ihrer hochkonservierten Kerndomäne die Möglichkeit einer Redundanz beziehungsweise eines gewebespezifischen „Annexin-Fingerabdrucks“ (Gerke & Moss 2002) auf der Oberfläche apoptotischer Zellen. Möglicherweise beinhaltet ein solcher Annexin-Fingerabdruck gewebespezifische Signale, die von den im entsprechenden Gewebe stationierten Subtypen dendritischer Zellen erkannt werden können.

Ein derartiger Einfluss anderer Annexine wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Die Daten von Mäusen mit einer genetischen Defizienz für Annexin V, Annexin VI und Annexin VII deuten aber darauf hin, dass nicht alle Annexine ein immunologisch relevantes Signal vermitteln (Brachvogel et al. 2003; Hawkins et al. 1999; Herr et al. 2001).

### **1.2 Annexin I wird während der Apoptose gespalten**

Annexin I ist sehr sensitiv bezüglich proteolytischer Spaltung, die präferentiell an der besonders exponierten Verbindung zwischen N-Terminus und Kerndomäne erfolgt (Barnes & Gomes 2002; Liu et al. 1995b). Auch in dieser Arbeit konnte mit fortschreitender Apoptose die Spaltung von Annexin I beobachtet werden (Abb. III.5). Das Molekulargewicht des Spaltproduktes entspricht mit einer Größe von ca. 33 kD der Kerndomäne ohne N-Terminus und wird von dem Antikörper DAC5, aber nicht von einem kommerziell erhältlichen anti-Annexin I Antikörper im Westernblot detektiert (Abb. III.3 und III.5).

Da der N-Terminus bereits als funktionelle Domäne eines anti-inflammatorischen Effektes von Annexin I charakterisiert wurde (Perretti et al. 1995; Perretti et al. 1993), könnte über dessen Abspaltung das Annexin I-Signal aufgehoben werden. In Analogie zu der enzymatischen Inaktivierung von Chemokinen und Hormonen (Struyf et al. 2003; Scholzen & Luger 2004) würde die Spaltung in diesem Fall zu einer zeitlichen Begrenzung des Signals führen. Ein funktionelles Annexin I-Signal wäre in diesem Fall nur auf früh-apoptotischen Zellen, nicht aber auf spätapoptotischen Zellen wirksam. Für diese Annahme sprechen die Daten in Abb. III.10A, nach denen ein inhibierendes Signal bei früh-apoptotischen (d1) Neutrophilen, nicht aber auf spät-apoptotischen (d4) Neutrophilen nachzuweisen war.

Alternativ könnte der abgespaltene N-Terminus auch als lösliches, anti-inflammatorisches Signal in die nähere Umgebung diffundieren und dort mit Zellen interagieren, die nicht direkt am Prozess der Phagozytose beteiligt sind. Für die letzte Hypothese sprechen Daten aus Versuchen mit Mäusen, bei denen ein anti-inflammatorisches Signal durch Injektion von Peptiden des N-Terminus von Annexin I hervorgerufen werden konnte (Getting et al. 1997; Harris et al. 1995). Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit kein lösliches Signal von apoptotischen Zellen nachgewiesen. Apoptotische Zellen konnten keinen inhibitorischen Einfluss auf dendritische Zellen ausüben, wenn sie durch eine Membran von den dendritischen Zellen getrennt wurden und demzufolge nur lösliche Moleküle, zum Beispiel der abgespaltene N-Terminus von Annexin I, die dendritischen Zellen erreichen konnten. (Abb. III.10A).

Die Bedeutung der Annexin I-Spaltung in der Apoptose ist daher zur Zeit unklar. Um die Rolle des abgespaltenen N-Terminus in Zukunft besser beurteilen zu können, sind weitere detaillierte Analysen mit Annexin I-Mutanten erforderlich, bei denen der N-Terminus fehlt beziehungsweise nicht mehr abgespalten werden kann.

### **1.3 Der Mechanismus der Annexin I-Translokation**

Ein weiterer Hinweis auf eine physiologische Rolle der Externalisierung von Annexin I ergibt sich aus der Abhängigkeit vom intrazellulären Energiezustand. Apoptose wird generell als ein energieabhängiger Vorgang beschrieben. Dementsprechend können bei Depletion des intrazellulären ATP keine Caspasen aktiviert werden, sodass ein nekrotischer Zelltod eintritt (Leist et al. 1999). Der

Vergleich von nekrotischen und apoptotischen Zellen zeigte, dass Annexin I unter nekrotischen Bedingungen deutlich langsamer als in apoptotischen Kontrollzellen externalisiert wurde (Abb. III.6). Diese schnelle und energieabhängige Externalisierung unter ATP-suffizienten, apoptotischen Bedingungen konnte auch bei Phosphatidylserin beobachtet werden und unterscheidet somit apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen.

Da während der Apoptose zunehmend pro-inflammatorische Signale auftreten (Shi et al. 2003; Chang et al. 2004), ist ein schneller Aufbau von anti-inflammatorischen Signalen wichtig, um die anti-inflammatorische Wirkung der Zellen in der frühen Phase der Apoptose sicher zu stellen. Die passive Diffusion intrazellulärer Bestandteile unter nekrotischen Bedingungen ermöglicht hingegen das zeitgleiche Auftreten zusätzlicher pro-inflammatorischer Moleküle, zum Beispiel von HMGB- und Hitzeschock-Proteinen (Scaffidi et al. 2002; Srivastava 2002) und führt zu einem pro-inflammatorischen Einfluss nekrotischer Zellen (Li et al. 2001a).

Der Mechanismus der Externalisierung von Annexin I ist, ebenso wie der von Phosphatidylserin, bisher weitgehend ungeklärt (Gerke et al. 2005; Williamson & Schlegel 2002). Die kinetischen Daten der Annexin I- und Phosphatidylserin-Externalisierung sprechen für eine enge Kopplung und gemeinsame Regulation der beiden Transport-Mechanismen (Abb. III.1B; III.4 und III.6). Zudem korreliert die Stärke der Annexin I-Expression (CEM T-Zellen > Jurkat T-Zellen > Raji) mit der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Phosphatidylserin-Exposition (Tab. III.1). Die Exposition von Phosphatidylserin kann jedoch in Erythrozyten nachgewiesen werden, die kein Annexin I besitzen (Kiefer & Snyder 2000). Daher ist die Expression von Annexin I keine Voraussetzung für die Exposition von Phosphatidylserin. Ob die Externalisierung von Phosphatidylserin durch Annexin I unterstützt wird, und ob Annexin I gegebenenfalls unabhängig von Phosphatidylserin externalisiert werden kann, könnte zum Beispiel mit Hilfe von Annexin I-transfizierten Raji-Zellen untersucht werden, die Phosphatidylserin unter apoptotischen Bedingungen nicht effektiv externalisieren können (Fadeel et al. 1999).

Eine zentrale Rolle bei der Externalisierung beider Moleküle scheint die Kalzium-Konzentration zu spielen. Im Fall der Externalisierung von Phosphatidylserin gibt es dafür direkte Belege. Einerseits kann die Scramblase-Aktivität allein durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium induziert werden, während die Chelatierung von extrazellulärem Kalzium andererseits die Externalisierung inhibiert (Verhoven et

al. 1995). Zusätzlich scheint auch die Oxidation von Phosphatidylserin einen Einfluss auf seine Externalisierung auszuüben (Tyurina et al. 2004).

Für eine Rolle von Kalzium bei der Externalisierung von Annexin I gibt es bislang nur indirekte Hinweise. Das Molekül bindet kalziumabhängig an Membranen, so dass der Anstieg des intrazellulären Kalziums im Verlauf der Apoptose (Hanson et al. 2004) die Bindung von Annexin I an Lipide der Zellmembran und die Externalisierung eventuell erst ermöglicht. Zudem induziert eine Behandlung mit NEM, die ebenfalls zu einem Kalziumanstieg innerhalb der Zelle führt (Waring et al. 1999), die Externalisierung von Annexin I. NEM führt aber durch die Alkylierung sensitiver Thiolreste in Molekülen wie Glutathion auch zu einem pro-oxidativen Zustand der Zelle, sodass ein zusätzlicher Effekt durch oxidative Prozesse sowie durch Alkylierung von Thiolresten in anderen Enzymen nicht ausgeschlossen werden kann. Ob die beschriebenen Bedingungen der Exposition von Phosphatidylserin zugleich ursächlich für die Exposition von Annexin I sind, und welche Faktoren im Verlauf der Apoptose die Exposition des Proteins beeinflussen, wird in künftigen Untersuchungen mit Kalziumbindungsmutanten von Annexin I beziehungsweise einer detaillierten Analyse einzelner apoptotischer Prozesse zu klären sein.

### **1.4 Annexin I ist *ex vivo* auf apoptotischen Thymozyten nachweisbar**

Durch die Analyse von primären humanen Thymozyten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Externalisierung von Annexin I nicht nur *in vitro* und bei Zelllinien auftritt (Tab. III.1.1), sondern auch in primären Geweben mit einem relativ hohen Anteil apoptotischer Zellen (Abb. III.7). Sowohl Annexin I als auch Phosphatidylserin wurden von etwa zehn Prozent der humanen Thymozyten exponiert. In anderen Untersuchungen zur Apoptose im Thymus konnte ein Anteil von ca. einem Prozent an Zellen mit fragmentierter DNA (muriner Thymus) beziehungsweise fünf Prozent Propidiumiodid-positive Zellen (humaner Thymus) nachgewiesen werden (Surh & Sprent 1994; Debatin et al. 1994). Daher erscheint der Anteil apoptotischer Zellen, die Annexin I beziehungsweise Phosphatidylserin exponieren, in dem gezeigten Experiment vergleichsweise hoch.

Dies könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Einerseits tritt die Exposition von Annexin I deutlich früher als die Fragmentierung der DNA und der Verlust der Membranintegrität auf (Abb. III.4). Da apoptotische Zellen im Thymus

sehr schnell und effizient von Makrophagen aufgenommen werden (Surh & Sprent 1994; Savill et al. 1993), sind spät-apoptotische Zellen eventuell bereits in den Phagolysosomen abgebaut und nicht mehr nachweisbar, sodass ein höherer Anteil früh-apoptotischer Zellen resultiert. Andererseits sterben Thymozyten bei Kultivierung *ex vivo* mit zunehmender Dauer der Kultur (Kishimoto et al. 1995), sodass die Zeit von der Entnahme des Thymus bis zur Kühlung auf Eis und der damit verbundene Zellstress einen höheren Anteil apoptotischer Zellen zur Folge haben können.

Die in Abb. III.7 detektierten Annexin I-positiven Zellen befinden sich exklusiv innerhalb einer Population von Thymozyten, die in hinsichtlich unterschiedlicher Merkmale als Population mit dem höchsten Anteil apoptotischer Zellen im Thymus charakterisiert worden ist. Einerseits exprimieren diese Zellen die beiden Korezeptoren CD4 und CD8, und unterliegen damit der positiven (und negativen) Selektion, in deren Verlauf mehr als 95 Prozent aller T-Zellen im Thymus sterben (Petrie et al. 1990; Robey & Fowlkes 1994). Andererseits weisen die Zellen eine hohe CD95- sowie eine mittlere CD3-Expression auf (Abb. III.7B und C). In dieser Population wurde ebenfalls der höchste Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen (Debatin et al. 1994). Eine unspezifische Exposition von Annexin I auf nicht-apoptotischen Zellen im Thymus kann daher größtenteils ausgeschlossen werden. Demnach stellt die Exposition von Annexin I nicht nur ein Kennzeichen früh-apoptotischer Zellen *in vitro* dar, sondern tritt auch bei apoptotischen Zellen *in vivo* auf.

### **1.5 Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer Zellen**

Apoptotische Zellen werden *in vivo* und *in vitro* bereits früh nach Initiation der Apoptose aufgenommen. Die Phagozytose der Zellen wird dabei durch viele Signale vermittelt, unter anderem durch das Auftreten von *Eat-Me*-Signalen auf der Oberfläche der Zellen, sowie durch den Verlust abstoßender Signale (Lauber et al. 2004). Daher wurde die Exposition von Annexin I im Hinblick auf eine Beteiligung bei der Phagozytose apoptotischer Zellen untersucht. Hierfür wurden differenzierte U-937-Zellen eingesetzt, die bereits in verschiedenen Untersuchungen zur Phagozytose apoptotischer Zellen verwendet wurden (Fan et al. 2004; Callahan et al.

2003). Im Gegensatz zu dem Bericht von Arur *et al.* 2003 konnte in dieser Arbeit kein Einfluss der Exposition von Annexin I auf die Phagozytose apoptotischer Zellen festgestellt werden (Arur *et al.* 2003). Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in den jeweils verwendeten zellulären Systemen liegen. Während in der Studie von Arur *et al.* Endothelzellen (Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur, HUVEC) verwendet wurden, die zu den nicht-professionellen Phagozyten gehören, wurden die in Abb. III.8 dargestellten Ergebnisse mit differenzierten U-937-Zellen gewonnen. Differenzierte U937-Zellen weisen Eigenschaften professioneller Phagozyten auf und besitzen womöglich ein vielfältigeres Repertoire für die Aufnahme apoptotischer Zellen, so dass sie nicht in gleichem Masse von Annexin I abhängig sind wie Endothelzellen. Ferner wurde in der Studie von Arur *et al.* hauptsächlich siRNA-vermittelte Reduktion der Annexin I-Expression eingesetzt. Dadurch konnte die generelle Expression von Annexin I zwar stark vermindert werden, aber diese Technik lässt auch Nebeneffekte erwarten (Achenbach *et al.* 2003), die sich zum Beispiel auf andere *Eat-Me*-Signale auswirken könnten. Die Rekonstitution mit aufgereinigtem Annexin I aus apoptotischen Zellen führte bei Arur *et al.* zu einer verstärkten Anhaftung apoptotischer Zellen an die Phagozyten. Ob die Phagozytose der Zellen gleichermaßen wieder hergestellt werden konnte, wurde jedoch nicht untersucht. Zudem birgt die Aufreinigung von extrazellulärem Annexin I apoptotischer Zellen die Gefahr der Kontamination durch andere *Eat-Me*-Signale. Da in der vorliegenden Arbeit weder durch die Reduktion der endogenen Expression von Annexin I noch bei Verwendung des rekombinanten Proteins ein Einfluss auf die Phagozytose festgestellt werden konnte (Abb. III.8B), scheint die Exposition von Annexin I nicht von herausragender Bedeutung für die Aufnahme apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten zu sein.

## 2. *Die Rolle von Annexin I bei der Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen*

### 2.1 **Apoptotische Zellen inhibieren die Reifung dendritischer Zellen**

In der Literatur existieren unterschiedliche Berichte hinsichtlich des Einflusses apoptotischer Zellen auf dendritische Zellen und auf die Auslösung einer Immunantwort. Während in vielen Untersuchungen ein inhibierender Effekt

apoptotischer Zellen auf dendritische Zellen und die Induktion von Toleranz nachgewiesen werden konnte, zeigen andere Autoren einen stimulierenden Einfluss auf die Immunantwort (Liu et al. 2002a; Hugues et al. 2002; Albert et al. 1998a; Russo et al. 2000). Dies ist möglicherweise auf Unterschiede bei der Präparation der apoptotischen Zellen oder auch der dendritischen Zellen zurückzuführen.

Besondere Bedeutung kommt hier der Präparation früh-apoptotischer Zellen zu, denn die Präsenz spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen während des Experimentes könnte den anti-inflammatorischen Effekt der früh-apoptotischen Zellen verdecken. Daher wurden in den Experimenten dieser Arbeit entweder früh-apoptotische Neutrophile nach eintägiger Kultivierung *in vitro* oder Jurkat T-Zellen eingesetzt, in denen mit einer geringen Dosis UV-Strahlung Apoptose ausgelöst wurde. In jedem Fall wurde die frühe Apoptose der Zellen durch Bestimmung der Membranintegrität sowie der Annexin I- und Phosphatidylserin-Exposition bestätigt.

Ein weiterer kritischer Parameter ist der Zustand der eingesetzten unreifen dendritischen Zellen. Hier zeigte sich bei der differentiellen Betrachtung vieler Präparationen, dass sowohl die Art der Präparation und das verwendete Medium wie auch der jeweilige Blutspender einen Einfluss auf den Zustand der dendritischen Zellen nach sechstägiger Differenzierung *in vitro* haben. Der Reifegrad der dendritischen Zellen wurde anhand der Oberflächenmarker CD83, CD86 und MHC-Klasse II bestimmt (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnten bei Verwendung von RPMI-Medium mit zehnpromzentigem Zusatz von fötalem Rinderserum unreife dendritische Zellen aus Monozyten differenziert werden, die jedoch in den meisten Fällen nach LPS-Stimulation sehr wenig TNF sekretierten. Deshalb eigneten sie sich nicht für eine Analyse des suppressiven Effektes apoptotischer Zellen. Bei Zusatz von einem Prozent Donorplasma beziehungsweise humanem Serum anstelle des Rinderserums wurden dendritische Zellen mit einem leicht höheren Reifungsgrad erhalten. Diese Zellen sekretierten jedoch in der Regel höhere Mengen TNF nach LPS-Stimulation und waren daher für Inhibitionsstudien mit apoptotischen Zellen besser geeignet. Trotzdem variierte die Sensitivität der primären dendritischen Zellen bezüglich der LPS-Konzentration erheblich. Je nach Reifungsgrad und Präparation der dendritischen Zellen wurden daher unterschiedliche Konzentrationen von LPS eingesetzt, die von fünf Nanogramm bis zu einem Mikrogramm LPS pro Milliliter Zellkulturmedium reichten.

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten bei der Präparation und Kultivierung erwies sich die Zellzahl geeigneter dendritischer Zellen häufig als limitierend für die Experimente. In vielen Fällen konnte zudem keine Aussage über den Einfluss der apoptotischen Zellen auf die dendritischen Zellen getroffen werden, da die Konzentration an LPS und damit die Sekretion von TNF offensichtlich zu gering war oder aber bereits innerhalb der Plateauphase der zellulären Antwort lag. Die Ergebnisse der relativ geringen Zahl aussagekräftiger Experimente werden jedoch durch interne Kontrollen der einzelnen Experimente, zum Beispiel Titrationen der LPS-Konzentration und die Transwell-Experimente, unterstützt. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse aus Experimenten mit primären dendritischen Zellen in dem zellulären Modellsystem mit differenzierten U-937-Zellen mit hoher Konsistenz bestätigt werden (Abb. III.11A und persönliche Kommunikation Lucie Dörner).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen inhibitorischen Effekt apoptotischer Neutrophiler und apoptotischer Jurkat T-Zellen auf die Reifung primärer dendritischer Zellen (Abb. III.9). Die Inhibition umfasste die Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie die Expression der Oberflächenmoleküle CD86 und MHC-Klasse II. Nicht alle untersuchten Oberflächenmoleküle waren gleichermaßen von der Inhibition betroffen, denn es konnte keine Änderung bei der Expression von CD40 und CD83 beobachtet werden. Daher scheint die Suppression der apoptotischen Zellen auf Ebene der Oberflächenmoleküle spezifisch und selektiv zu sein. Unter dem Einfluss apoptotischer Zellen führt die Stimulierung dendritischer Zellen also zu einem Phänotyp, der sich deutlich von dem unreifer wie auch reifer dendritischer Zellen unterscheidet und dem Phänotyp von pulmonalen dendritischen Zellen ähnelt, die nach intranasaler Gabe eines Modellantigens gebildet werden (Akbari et al. 2001). Diese pulmonalen dendritischen Zellen können T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften induzieren. Sie sekretieren Interleukin-10 (die Sekretion von TNF wurde nicht untersucht) und weisen eine verminderte Expression von CD86 und MHC-Klasse II-Molekülen im Vergleich zu reifen, immunogenen dendritischen Zellen auf, während die Expression von CD40 nicht verändert ist. Daher scheint der Einfluss apoptotischer Zellen die Entwicklung eines tolerogenen Phänotyps der dendritischen Zellen zu begünstigen. In zukünftigen Experimenten sollte dieser dendritische Phänotyp unter Einbeziehung weiterer Zytokine und Moleküle detaillierter untersucht werden.



### 2.2 Annexin I inhibiert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Apoptotische Zellen verfügen über eine Vielzahl immunologisch wirksamer Moleküle. Neben zelltypischen Oberflächenmolekülen (zum Beispiel CD40-Ligand auf T-Zellen) und den apoptosespezifischen Oberflächenveränderungen werden im Verlauf der Apoptose intrazelluläre Moleküle neu gebildet (zum Beispiel Harnsäure) und lösliche Botenstoffe wie Lysophosphatidylcholin sekretiert (Shi & Rock 2002; Lauber et al. 2003). Um eine spezifische Rolle von Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen bei der Inhibition der Reifung dendritischer Zellen nachzuweisen, wurde das Molekül mit F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers DAC5 blockiert. Tatsächlich konnte dadurch der suppressive Einfluss apoptotischer Zellen auf die LPS-induzierte Sekretion von TNF partiell aufgehoben werden (Abb. III.10A). Darüberhinaus konnte die TNF-Sekretion auch durch Zugabe von rekombinantem Annexin I dosisabhängig inhibiert werden (Abb. III.10B). Diese Ergebnisse belegen einen direkten inhibierenden Einfluss von Annexin I auf dendritische Zellen. Allerdings konnte die Inhibition der TNF-Sekretion durch Blockierung von Annexin I mit den DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten je nach Experiment nur zu etwa 20 bis 60 Prozent aufgehoben werden (Abb. III.10A, III.11A und Daten nicht gezeigt). Möglicherweise blockieren die F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente des Antikörpers DAC5, der an die Kerndomäne von Annexin I bindet (Abb III.5), die Interaktion des Proteins mit dendritischen Zellen nur teilweise. Dies träfe insbesondere dann zu, wenn der inhibitorische Effekt von Annexin I hauptsächlich über den N-Terminus vermittelt wird.

Eine alternative Erklärung für den partiellen Effekt der DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente wäre die Existenz zusätzlicher inhibitorischer Moleküle auf apoptotischen Zellen. Da durch die Transwell-Experimente ein Einfluss löslicher Moleküle weitgehend ausgeschlossen werden kann (Abb. III.10A), kommen dafür neben weiteren Annexinen (Abb. III.3) vor allem zell- oder matrixgebundene, anti-inflammatorische Moleküle wie TGF- $\beta$  in Betracht (Ramirez & Rifkin 2003; Gregg et al. 2004; Solovyan & Keski-Oja 2005). Daher sollte der Einfluss weiterer anti-inflammatorischer Moleküle auf apoptotischen Zellen zukünftig genauer untersucht werden.

Der Beitrag von Annexin I zum suppressiven Effekt apoptotischer Zellen könnte zusätzlich durch Rezeptorbindungs-Mutanten des Proteins beziehungsweise durch andere, möglicherweise stärker blockierende anti-Annexin I Antikörper untersucht werden. Zusätzlich könnte die Expression von Annexin I in apoptotischen T-Zelllinien durch Transfektion mit einer gegen Annexin I gerichteten siRNA vermindert werden

(Abb. III.8C). Dabei muss sicher gestellt werden, dass nicht nur die intrazelluläre Expression, sondern auch die Menge des externalisierten Annexin I stark vermindert wird.

### **2.3 Der inhibitorische Effekt von Annexin I ist unabhängig von der Art des Toll Like Rezeptor Stimulus**

In den Kokultur-Experimenten zeigte sich bei Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden, dass Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen eine weit reichende Inhibition der TLR-Signale bewirkte. Die Inhibition war nicht abhängig von der Art des jeweiligen TLR oder von den in den entsprechenden Signalwegen auftretenden Adaptermolekülen MyD88 und TRIF (Abb. III.11A). Obwohl die Sekretion des regulatorischen Zytokins Interleukin-10 ebenfalls durch Behandlung mit LPS hervorgerufen wird (Brightbill et al. 2000), wurde die Sekretion in diesem Fall nicht durch apoptotische Zellen inhibiert (Abb. III.11B). Diese differentielle Inhibition von TNF und Interleukin-10 steht im Einklang mit anderen Untersuchungen über die TLR-Signaltransduktion, in denen ebenfalls eine unabhängige Regulation pro- und anti-inflammatorischer Zytokine nachgewiesen wurde (Visser et al. 1998; Martin et al. 2005). Für Interleukin-10 wurde einerseits eine Rolle bei der Differenzierung und für die Effektorfunktion regulatorischer T-Zellen nachgewiesen, andererseits kann durch den Einfluss dieses Zytokins ein tolerogener Phänotyp in dendritischen Zellen selbst hervorgerufen werden (Mekala et al. 2005; Steinbrink et al. 2002; Wakkach et al. 2003). Demnach führt die spezifische Inhibition der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion bei unveränderter Sekretion von Interleukin-10 zu einem Phänotyp dendritischer Zellen, der die Induktion peripherer Toleranz unterstützen könnte.

### **2.3 Annexin I auf apoptotischen Zellen beeinflusst die T-Zell-Stimulation dendritischer Zellen**

Die Fähigkeit zur Stimulation naiver T-Zellen ist bei dendritischen Zellen in einzigartiger Weise ausgeprägt und grundlegend für die herausragende Bedeutung dieser antigenpräsentierenden Zellen bei der Auslösung und Beeinflussung der Immunantwort (Steinman & Witmer 1978). Unter Berücksichtigung der Probleme bei der Kultivierung primärer dendritischer Zellen konnten in dieser Arbeit nur wenige

Daten über die Rolle von Annexin I hinsichtlich einer Beeinflussung der T-Zell-Stimulation durch dendritische Zellen gewonnen werden. Dennoch deuten die vorläufigen Ergebnisse von Abb. III.12 auf eine antigenspezifische Suppression der T-Zellproliferation durch Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen.

In diesem Experiment wurden naive T-Zellen von dendritischen Zellen stimuliert, die zuvor mit apoptotischen Zellen kokultiviert worden waren. Die Auswirkungen dieser primären, antigenspezifischen Stimulation der T-Zellen wurden daraufhin durch eine zweite, ebenfalls antigenspezifische Restimulation untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die primäre Kontrollstimulation mit dendritischen Zellen zu einer hohen antigenspezifischen Proliferation der restimulierten T-Zellen führte (Abb. III.12B). Im Gegensatz dazu führte die primäre Stimulation mit dendritischen Zellen, die zuvor mit apoptotischen Zellen kokultiviert worden waren, zu einer stark verringerten Proliferation der restimulierten T-Zellen. Da die Proliferation dieser T-Zellen sogar geringer war als bei T-Zellen, die nicht primär stimuliert wurden, scheint die Kokultur dendritischer Zellen mit apoptotischen Zellen zu einer Inhibition der T-Zell-Antwort zu führen. Diese Inhibition war antigenspezifisch, da die allogene Restimulation der gleichen Zellen sogar zu einer höheren Proliferation als in der Kontrollstimulation führte (Abb. III.12C). Demnach zeigte sich in den inhibierten T-Zellen kein Hinweis auf eine generelle Blockade der Proliferation. Vielmehr wurde in der entsprechenden T-Zellpopulation eine Toleranz gegen das Modellantigen erzeugt, wobei die Reaktivität gegen allogene MHC-Moleküle erhalten blieb. Da eine allogene Stimulation im Vergleich zur antigenspezifischen Stimulation jedoch einen wesentlich stärkeren Stimulus darstellt, könnte in diesem Fall ein inhibierender Effekt apoptotischer Zellen verdeckt worden sein. Um den Grad der antigenspezifischen Inhibition durch apoptotische Zellen weiter zu untersuchen, sollte in zukünftigen Experimenten ein vergleichbarer T-Zell-Stimulus unter Verwendung eines zweiten Modellantigens (z.B. Tetanus-Toxoid) hinzugenommen werden.

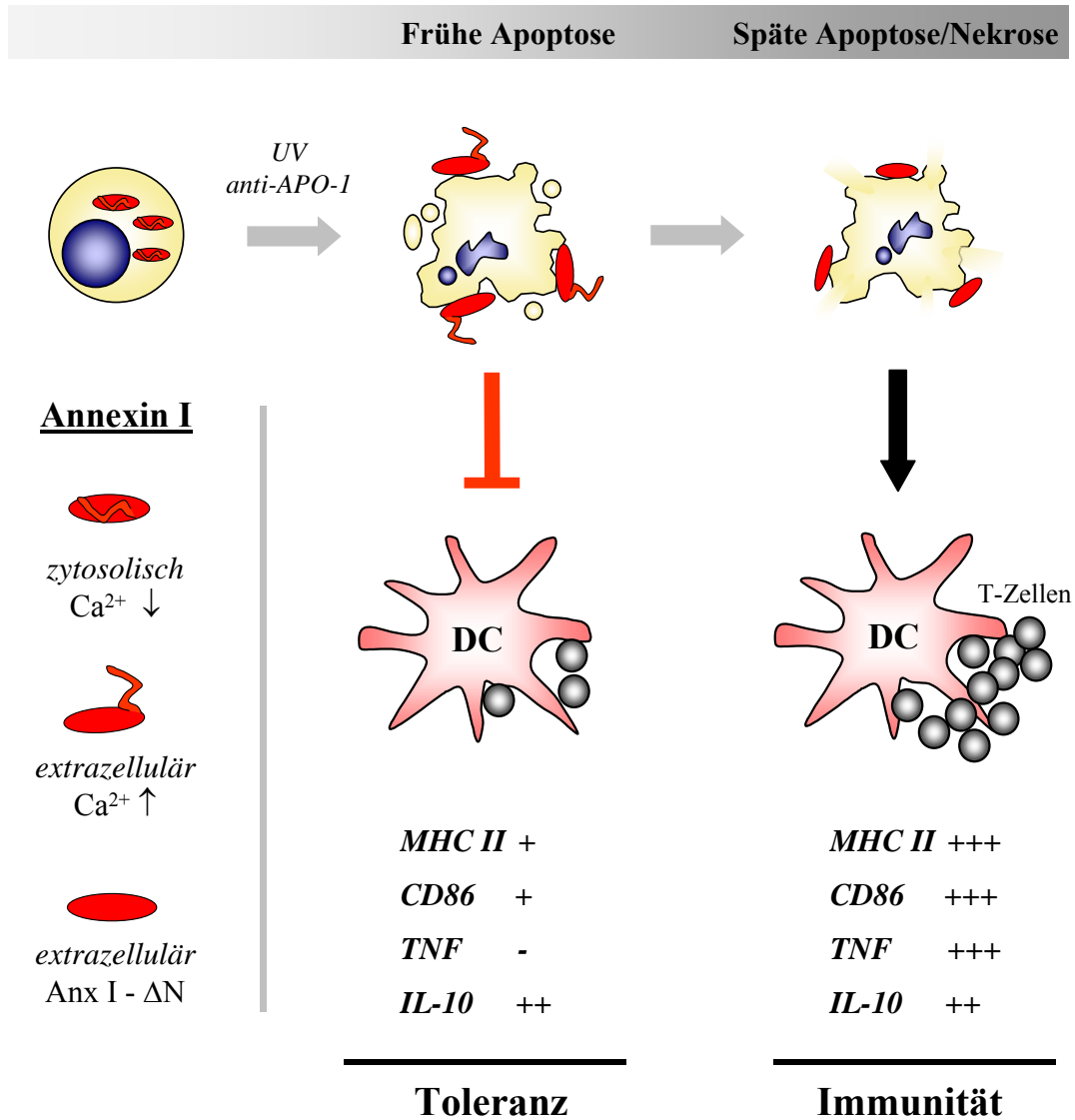
Die Rolle von Annexin I wurde in diesem Experiment wiederum durch Blockierung mit Hilfe von DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten untersucht. Während die allogene Reaktivität der T-Zellen durch den Zusatz der DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente nicht verändert wurde, konnte die antigenspezifische Toleranz der T-Zell-Population durch die Blockierung von Annexin I teilweise aufgehoben werden. Die Exposition von Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen scheint demnach zu einem Phänotyp dendritischer Zellen beizutragen, der in naiven T-Zellen Toleranz induzieren kann. Die Toleranz in

der T-Zellpopulation könnte einerseits durch Deletion der reaktiven T-Zellen erfolgt sein, andererseits könnte in den entsprechenden T-Zellen auch Anergie oder ein regulatorischer Phänotyp induziert worden sein (Abbas et al. 2004). Alternativ könnte die Phagozytose apoptotischer Zellen in den dendritischen Zellen auch zu einer Überladung des endozytischen Kompartments und damit zu einer geringeren Präsentation des Modellantigens geführt haben. In diesem Fall wäre die Kapazität der dendritischen Zellen zur antigenspezifischen Stimulation der T-Zellen ebenfalls geringer. Gegen die letzte Annahme spricht jedoch, dass die Zugabe von DAC5-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten den inhibitorischen Effekt wieder aufheben konnte.

Der Phänotyp der toleranten T-Zellen, die in diesem Experiment entstanden sind, konnte in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Eine Analyse der Oberflächenmoleküle CD25, CTLA4 und des Transkriptionsfaktors FoxP3 könnte zukünftig Hinweise auf die Veränderungen im Phänotyp der T-Zellen und damit auf die Art der erzeugten Toleranz geben. Zusätzlich sollten die auf diese Weise erzeugten T-Zellen in Kokultur-Experimenten mit naiven T-Zellen auf ihre regulatorischen Eigenschaften hin untersucht werden.

### **2.5 Ein Modell zur Annexin I-abhängigen Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das zytosolische Molekül Annexin I in einer frühen Phase der Apoptose auf der äußeren Zellmembran exponiert wird. Bei der Untersuchung des Einflusses apoptotischer Zellen auf die LPS-induzierte Reifung dendritischer Zellen konnte ferner ein inhibitorischer Effekt apoptotischer Zellen beobachtet werden, der sich zu einem großen Teil auf Annexin I zurückführen ließ (Abb. IV.1). Die Inhibition der dendritischen Zellen erfolgte auf mehreren Ebenen. Neben einer stark verminderten Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF wurde eine reduzierte Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD86 und der MHC-Klasse II-Moleküle auf den dendritischen Zellen detektiert. Die LPS-induzierte Sekretion des regulatorischen Zytokins Interleukin-10 wurde von apoptotischen Zellen hingegen nicht beeinträchtigt. Funktionell waren die entsprechenden dendritischen Zellen nicht mehr in der Lage, T-Zellen effizient zu stimulieren. Stattdessen wurde von den dendritischen Zellen eine antigenspezifische Toleranz in der T-Zellpopulation induziert.



**Abb. IV.1: Modell der Interaktion apoptotischer Zellen mit dendritischen Zellen.**

Das zytosolische Protein Annexin I wird nach Auslösung von Apoptose, z.B. durch UV-Strahlung oder Aktivierung des CD95-Signalweges mit anti-APO-1, auf der äußeren Seite der Zellmembran exponiert. Dort kann es bei der Phagozytose der apoptotischen Zellen durch dendritische Zellen deren Reifung inhibieren. Die Inhibition führt zu einer geringeren Expression der Moleküle MHC-Klasse II und CD86 auf der Oberfläche der dendritischen Zellen sowie zu einer stark verminderten Sekretion von TNF, während die Sekretion von Interleukin-10 (IL-10) unbeeinträchtigt bleibt. Die inhibierten dendritischen Zellen können naive T-Zellen nicht effizient stimulieren und führen zu einer antigenspezifischen Toleranz der T-Zellen. Bei spät-apoptotischen Zellen ist die Membranintegrität der Zellen zerstört und der N-Terminus von Annexin I größtenteils abgespalten (Anx I – ΔN). Diese Zellen inhibieren die Reifung der dendritischen Zellen nicht, sodass eine hohe Expression kostimulatorischer Moleküle zusammen mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu einer effizienten Stimulation naiver T-Zellen und zur Induktion einer adaptiven Immunantwort führen.

Die Inhibition der dendritischen Zellen konnte bei spät-apoptotischen Zellen nicht beobachtet werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die Inaktivierung des Annexin I-Signales durch Abspaltung des N-Terminus sein. Zusätzlich treten bei spät-apoptotischen Zellen weitere pro-inflammatorische Signale wie oxidierte Lipide und Harnsäure auf (Shi et al. 2003; Chang et al. 2004). Zusammen mit intrazellulären Molekülen wie ATP und Hitzeschockproteinen, die aufgrund der zerstörten Zellmembran aus den Zellen diffundieren können (Hanley et al. 2004; Rock et al. 2005), führen diese Signale offenbar zu einem immunstimulatorischen Einfluss spät-apoptotischer Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen anti-inflammatorische Eigenschaften von Annexin I, die im Einklang mit bereits beschriebenen entzündungshemmenden Effekten von Annexin I stehen. So konnten verschiedene experimentelle Entzündungsreaktionen durch Injektion von Annexin I beziehungsweise von Peptiden des Proteins gemildert werden (Yang et al. 1997; Cirino et al. 1993). Bei Inhibition von Annexin I durch Antikörper hingegen zeigten sich verstärkte Zymosan-induzierte Entzündungsreaktionen (z.B. Ödeme) (Perretti et al. 1996). Erhöhte Immunreaktionen konnten gleichfalls in Mäusen mit einer genetischen Defizienz für Annexin I nachgewiesen werden (Hannon et al. 2003). Es ist anzunehmen, dass die Inhibition pro-inflammatorischer Zytokine durch Annexin I (siehe Abbildungen III.9. bis III.11) zu den beobachteten Effekten beiträgt.

Der bisher angenommene Wirkungsmechanismus von Annexin I bezieht sich jedoch in erster Linie auf die Chemotaxis von Neutrophilen, die zum angeborenen Immunsystem gehören (Perretti & Gavins 2003). Im Unterschied dazu konnte in dieser Arbeit ein direkter Einfluss auf das adaptive Immunsystem gezeigt werden. Den Ergebnissen der Abbildungen III.9 und III.12 zufolge erstreckt sich die anti-inflammatorische Wirkung von Annexin I nicht nur auf das Zytokin-Milieu am Ort der Entzündung, sondern trägt darüber hinaus zur Induktion peripherer Toleranz im Organismus bei. Bei der Phagozytose apoptotischer Zellen durch dendritische Zellen führt Annexin I auf der Oberfläche der sterbenden Zellen offenbar zu einem tolerogenen Phänotyp dendritischer Zellen, der die produktive Stimulation von T-Zellen verhindert und stattdessen zu einer antigenspezifischen Toleranzentwicklung in den T-Zellen beiträgt.

Da die Bedingungen der Zellkultur *in vitro* nur Anhaltspunkte für die physiologische Situation im Organismus geben können, sollte die Rolle von Annexin I bei der

Induktion peripherer Toleranz gegen eigenes Gewebe *in vivo* verifiziert werden. Die bisherigen Daten lassen vor allem Auswirkungen auf T-Zell-abhängige Immunantworten erwarten, deshalb könnte für *in-vivo*-Experimente ein Modell zur Toleranzentwicklung in Mäusen mit transgenem T-Zell-Rezeptor verwendet werden. In OT II-Mäusen, deren T-Zellen Rezeptoren für ein Peptid des Proteins Ovalbumin besitzen (Barnden et al. 1998), könnte die Entwicklung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort gegen Ovalbumin leicht experimentell verfolgt werden. Bei Gabe von Ovalbumin in Abhängigkeit von apoptotischen Zellen beziehungsweise Annexin I könnte mit Hilfe dieser Mäuse der Einfluss apoptotischer Zellen und von Annexin I auf die Aktivierung und den Phänotyp der T-Zellen untersucht werden.

Die funktionellen Domänen von Annexin I und die physiologische Rolle der Abspaltung des N-Terminus sind bisher ebenfalls ungeklärt. Die Analyse von Mutanten des Proteins kann hier weitere Erkenntnisse über den Wirk-Mechanismus der Inhibition und die Wechselwirkung mit einem postulierten Annexin I-Rezeptor auf dendritischen Zellen ermöglichen. Zusätzlich könnte die Aufklärung der Prozesse, die zur Externalisierung von Annexin I führen, Möglichkeiten der Beeinflussung der Annexin I-Exposition und somit der Immunogenität von Zell-Vakzinen oder Transplantaten eröffnen.

Zusammenfassend könnten Erkenntnisse aus den genannten Experimenten helfen, die physiologischen Bedingungen bei der Induktion peripherer Toleranz aufzuklären und mit Hilfe von Annexin I oder blockierenden Antikörpern zu beeinflussen. Eine solche Manipulation peripherer Toleranzmechanismen wäre vor allem für die Optimierung von Tumorthérapien und bei der Transplantationsmedizin von großem Nutzen.

## V. Anhang

### 1. Literatur

Abbas, A. K., Lohr, J., Knoechel, B. & Nagabhushanam, V. 2004. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun.Rev.* 3: 471-475.

Achenbach, T. V., Brunner, B. & Heermeier, K. 2003. Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *Chembiochem.* 4: 928-935.

Adams, J. M. & Cory, S. 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 715-720.

Akbari, O., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat.Immunol.* 2: 725-731.

Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8: 1024-1032.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. & Bhardwaj, N. 1998a. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 188: 1359-1368.

Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. 1998b. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89.

Anders, H. J., Vielhauer, V., Eis, V., Linde, Y., Kretzler, M., Perez de Lema, G., Strutz, F., Bauer, S., Rutz, M., Wagner, H., Grone, H. J. & Schlondorff, D. 2004. Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *The FASEB Journal* 03-0646fje.

Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C. P., Shu, H. & 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. & Mathis, D. 2002. Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298: 1395-1401.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. & von Boehmer, H. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3: 756-763.



- Apostolou, I. & von Boehmer, H. 2004. In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 199: 1401-1408.
- Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., Mohler, W. & Han, D. K. 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev.Cell* 4: 587-598.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp.Med.* 190: 995-1004.
- Azuma, Y., Inami, Y. & 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.
- Babiychuk, E. B. & Draeger, A. 2000. Annexins in Cell Membrane Dynamics: Ca<sup>2+</sup>-regulated Association of Lipid Microdomains. *The Journal of Cell Biology* 150: 1113-1124.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18: 767-811.
- Barnden, M. J., Allison, J. A. N., Heath, W. R. & Carbone, F. R. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based - and -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and Cell Biology* 76: 34-40.
- Barnes, J. A. & Gomes, A. V. 2002. Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol.Cell Biochem.* 231: 1-7.
- Barton, G. M. & Medzhitov, R. 2002. Toll-like receptors and their ligands. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 270: 81-92.
- Bastian, B. C., Sellert, C., Seekamp, A., Romisch, J., Paques, E. P. & Brocker, E. B. 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. & 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.
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 40: 845-859.
- Beutler, B. 2005. The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* 1-8.
- Bicknell, S., van Eeden, S., Hayashi, S., Hards, J., English, D. & Hogg, J. C. 1994. A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 10: 16-23.

- Binder, R. J., Han, D. K. & Srivastava, P. K. 2000. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat.Immunol.* 1: 151-155.
- Blander, J. M. & Medzhitov, R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304: 1014-1018.
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B. C., Marshak-Rothstein, A. & Chen, J. 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 1184-1189.
- Bose, J., Gruber, A. D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Kontgen, F. & Lengeling, A. 2004. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J.Biol.* 3: 15.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A. E., Thompson, E. M., Cook, H. T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P. P. & Walport, M. J. 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat.Genet.* 19: 56-59.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P. & 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., der Mark, K., Hofmann, C. & Poschl, E. 2003. Annexin A5 Is Not Essential for Skeletal Development. *Molecular and Cellular Biology* 23: 2907-2913.
- Brand, C. U., Hunger, R. E., Yawalkar, N., Gerber, H. A., Schaffner, T. & Braathen, L. R. 1999. Characterization of human skin-derived CD1a-positive lymph cells. *Archives of Dermatological Research* 291: 65-72.
- Bratton, D. L. & Henson, P. M. 2005. Autoimmunity and apoptosis: refusing to go quietly. *Nat Med* 11: 26-27.
- Bretscher, M. S. 1972. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat.New Biol.* 236: 11-12.
- Brightbill, H. D., Plevy, S. E., Modlin, R. L. & Smale, S. T. 2000. A Prominent Role for Sp1 During Lipopolysaccharide- Mediated Induction of the IL-10 Promoter in Macrophages. *The Journal of Immunology* 164: 1940-1951.
- Burnet, F. M. 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. Nashville.
- Callahan, M. K., Halleck, M. S., Krahling, S., Henderson, A. J., Williamson, P. & Schlegel, R. A. 2003. Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells. *J.Leukoc.Biol.* 74: 846-856.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G. & Rosen, A. 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 179: 1317-1330.
- Castro-Caldas, M., Duarte, C. B., Carvalho, A. P. & Lopes, M. C. 2002. Dexamethasone induces the secretion of annexin I in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Mol.Cell Biochem.* 237: 31-38.

- Castro-Caldas, M., Duarte, C. B., Carvalho, A. R. & Lopes, M. C. 2001. 17beta-estradiol promotes the synthesis and the secretion of annexin I in the CCRF-CEM human cell line. *Mediators.Inflamm.* 10: 245-251.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., van Kooten, C., Durand, I. & Banchereau, J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of Experimental Medicine* 180: 1263-1272.
- Chang, M. K., Bergmark, C., Laurila, A., Horkko, S., Han, K. H., Friedman, P., Dennis, E. A. & 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 6353-6358.
- Chang, M. K., Binder, C. J., Miller, Y. I., Subbanagounder, G., Silverman, G. J., Berliner, J. A. & Witztum, J. L. 2004. Apoptotic Cells with Oxidation-specific Epitopes Are Immunogenic and Proinflammatory. *The Journal of Experimental Medicine* 200: 1359-1370.
- Chapman, L. P., Epton, M. J., Buckingham, J. C., Morris, J. F. & Christian, H. C. 2003. Evidence for a role of the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 144: 1062-1073.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. j., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. 2003. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1875-1886.
- Cirino, G., Cicala, C., Sorrentino, L., Ciliberto, G., Arpaia, G., Perretti, M. & Flower, R. J. 1993. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br.J.Pharmacol.* 108: 573-574.
- Clark, D. M., Moss, S. E., Wright, N. A. & Crumpton, M. J. 1991. Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. *Histochemistry and Cell Biology (Historical Archive)* 96: 405-412.
- Cohen, P. L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T. D., Jennette, J. C., Roubey, R. A., Earp, H. S., Matsushima, G. & Reap, E. A. 2002. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 135-140.
- Coller, H. A. & Coller, B. S. 1983. Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma* 2: 91-96.
- Comera, C. & Russo-Marie, F. 1995. Glucocorticoid-induced annexin 1 secretion by monocytes and peritoneal leukocytes. *Br.J.Pharmacol.* 115: 1043-1047.
- Creutz, C. E., Pazoles, C. J. & Pollard, H. B. 1978. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry* 253: 2858-2866.

- Creutz, C. E., Snyder, S. L., Daigle, S. N. & Redick, J. 1996. Identification, localization, and functional implications of an abundant nematode annexin. *The Journal of Cell Biology* 132: 1079-1092.
- D'Amico, M., Di Filippo, C., La, M., Solito, E., McLean, P. G., Flower, R. J., Oliani, S. M. & Perretti, M. 2000. Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. *FASEB J.* 14: 1867-1869.
- Dale, H. H., Ehrlich, P., Himmelweit, F. & Marquardt, M. 1956. The Collected Papers of Paul Ehrlich ... Including a complete bibliography. Compiled and edited by F. Himmelweit ... with the assistance of Martha Marquardt. Under the editorial direction of Sir Henry Dale, etc. [With a portrait.]. London & New York; Vienna printed : Pergamon Press.
- Danielsen, E. M., van Deurs, B. & Hansen, G. H. 2003. "Nonclassical" secretion of annexin A2 to the luminal side of the enterocyte brush border membrane. *Biochemistry* 42: 14670-14676.
- de Coupade, C., Gillet, R., Bennoun, M., Briand, P., Russo-Marie, F. & Solito, 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.
- Debatin, K. M., Suss, D. & Krammer, P. H. 1994. Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection? *Eur.J.Immunol.* 24: 753-758.
- Debret, R., El Btaouri, H., Duca, L., Rahman, I., Radke, S., Haye, B., Sallenave, J. M. & Antonicelli, F. 2003. Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett.* 546: 195-202.
- Deckwerth, T. L., Elliott, J. L., Knudson, C. M., Johnson, E. M., Jr., Snider, W. D. & Korsmeyer, S. J. 1996. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 17: 401-411.
- Della, G. B., Braut-Boucher, F., Bomsel, M., Chatelet, F., Guguen-Guillouzo, C., Font, J., Weinman, J. & Weinman, S. 2001. Annexin expressions are temporally and spatially regulated during rat hepatocyte differentiation. *Dev.Dyn.* 222: 206-217.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & 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. & Gregory, C. D. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509.
- Devitt, A., Parker, K. G., Ogden, C. A., Oldreive, C., Clay, M. F., Melville, L. A., Bellamy, C. O., Lacy-Hulbert, A., Gangloff, S. C., Goyert, S. M. & Gregory, C. D. 2004. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of Cell Biology* 167: 1161-1170.

Dhodapkar, M. V. & Steinman, R. M. 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100: 174-177.

Doubell, A. F., Lazure, C., Charbonneau, C. & Thibault, G. 1993. Identification and immunolocalisation of annexins V and VI, the major cardiac annexins, in rat heart. *Cardiovasc.Res.* 27: 1359-1367.

Dreier, R., Schmid, K. W., Gerke, V. & Riehemann, K. 1998. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem.Cell Biol.* 110: 137-148.

Duncan, G. S., Peers, S. H., Carey, F., Forder, R. & Flower, R. J. 1993. The local anti-inflammatory action of dexamethasone in the rat carrageenin oedema model is reversed by an antiserum to lipocortin 1. *Br.J.Pharmacol.* 108: 62-65.

Eda, S., Yamanaka, M. & Beppu, M. 2004. Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 279: 5967-5974.

Erdosova, B., Hlavkova, L., Prochazkova, J. & Lichnovsky, V. 2002. Part of CD68<sup>+</sup> macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.* 146: 41-45.

Ernst, S., Lange, C., Wilbers, A., Goebeler, V., Gerke, V. & Rescher, U. 2004. An annexin 1 N-terminal peptide activates leukocytes by triggering different members of the formyl peptide receptor family. *J.Immunol.* 172: 7669-7676.

Euzger, H. S., Flower, R. J., Goulding, N. J. & Perretti, M. 1999. Differential modulation of annexin I binding sites on monocytes and neutrophils. *Mediators.Inflamm.* 8: 53-62.

Fadeel, B., Gleiss, B., Hogstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P. J., Henter, J. I., Orrenius, S. & Samali, A. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 266: 504-511.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. & 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. & Henson, P. M. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405: 85-90.

Fadok, V. A., Savill, J. S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D. E., Campbell, P. A. & Henson, P. M. 1992a. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J.Immunol.* 149: 4029-4035.

- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. & Henson, P. M. 1992b. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* 148: 2207-2216.
- Fan, X., Krahling, S., Smith, D., Williamson, P. & Schlegel, R. A. 2004. Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol.Biol.Cell* 15: 2863-2872.
- Ferguson, T. A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T. S., Schoenberger, S. & 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. & Parente, L. 2003. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int.Immunopharmacol.* 3: 1363-1369.
- Fink, S. L. & Cookson, B. T. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73: 1907-1916.
- Fischer, U., Janicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* 10: 76-100.
- Flower, R. J. & Rothwell, N. J. 1994. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol.Sci.* 15: 71-76.
- Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A. & McCarthy, R. E. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18: 522-529.
- Franc, N. C. 2002. Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and Drosophila melanogaster: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci.* 7: d1298-d1313.
- Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G. S. 2004. The protein structures that shape caspase-activity, specificity, activation, and inhibition. *Biochem.J.* Pt.
- Fujii, C., Shiratsuchi, A., Manaka, J., Yonehara, S. & Nakanishi, Y. 2001. Difference in the way of macrophage recognition of target cells depending on their apoptotic states. *Cell Death.Differ.* 8: 1113-1122.
- Furge, L. L., Chen, K. & Cohen, S. 1999. Annexin VII and Annexin XI Are Tyrosine Phosphorylated in Peroxovanadate-treated Dogs and in Platelet-derived Growth Factor-treated Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33504-33509.
- Gascoigne, N. R. & Zal, T. 2004. Molecular interactions at the T cell-antigen-presenting cell interface. *Curr.Opin.Immunol.* 16: 114-119.
- Gavins, F. N., Yona, S., Kamal, A. M., Flower, R. J. & Perretti, M. 2003. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1. *Blood* 101: 4140-4147.

- Gerke, V. & Moss, S. E. 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim.Biophys.Acta* 1357: 129-154.
- Gerke, V. & Moss, S. E. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 82: 331-371.
- Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. 2005. Annexins: Linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 449-461.
- Getting, S. J., Flower, R. J. & Perretti, M. 1997. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br.J.Pharmacol.* 120: 1075-1082.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 51: 1417-1423.
- Glucksmann, A. 1965. Cell death in normal development. *Arch.Biol.(Liege)* 76: 419-437.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., Trent, R. J. & Basten, A. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334: 676-682.
- Green and John 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* 23: 515-548.
- Gregg, R. K., Jain, R., Schoenleber, S. J., Divekar, R., Bell, J. J., Lee, H. H., Yu, P. & Zaghoulani, H. 2004. A Sudden Decline in Active Membrane-Bound TGF- $\beta$  Impairs Both T Regulatory Cell Function and Protection against Autoimmune Diabetes. *The Journal of Immunology* 173: 7308-7316.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20: 621-667.
- Guzman-Aranguez, A., Olmo, N., Turnay, J., Lecona, E., Perez-Ramos, P., Lopez, d. S., I & Lizarbe, 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. & 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.
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M. F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J. M., Devaux, P. F., McNeish, J., Marguet, D. & Chimini, G. 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat.Cell Biol.* 2: 399-406.

- Hampton, M. B., Vanags, D. M., Porn-Ares, M. I. & Orrenius, S. 1996. Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. *FEBS Lett.* 399: 277-282.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & 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. & 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., Dalpke, A. H., Sus, R., Heeg, K. M., Preisig-Muller, R. & Daut, J. 2004. Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 9479-9484.
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., Gavins, F. N., Perretti, M., Morris, J. F., Buckingham, J. C. & Flower, R. J. 2003. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1<sup>-/-</sup> mouse. *FASEB J.* 17: 253-255.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. 2004. Cell Signalling: IP3 Receptors Channel Calcium into Cell Death. *Current Biology* 14: R933-R935.
- Harris, J. G., Flower, R. J. & Perretti, M. 1995. Alteration of neutrophil trafficking by a lipocortin 1 N-terminus peptide. *Eur.J.Pharmacol.* 279: 149-157.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 769-779.
- Hawkins, T. E., Roes, J., Rees, D., Monkhouse, J. & Moss, S. E. 1999. Immunological Development and Cardiovascular Function Are Normal in Annexin VI Null Mutant Mice. *Molecular and Cellular Biology* 19: 8028-8032.
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., Yamane, T., Ogawa, M., Nishikawa, S. I., Ryoike, K., Inaba, K., Hayashi, S. I. & Kunisada, T. 2001. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- $\beta$ 1-dependent cells. *International Immunology* 13: 695-704.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E. & Shortman, K. 2001. The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *The Journal of Immunology* 167: 741-748.
- Herr, C., Smyth, N., Ullrich, S., Yun, F., Sasse, P., Hescheler, J., Fleischmann, B., Lasek, K., Brixius, K., Schwinger, R. H. G., Fassler, R., Schroder, R. & Noegel, A. A. 2001. Loss of Annexin A7 Leads to Alterations in Frequency-Induced Shortening of Isolated Murine Cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4119-4128.



- Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A. & Henson, P. M. 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *The Journal of Cell Biology* 155: 649-659.
- Huang, D. C. S. & Strasser, A. 2000. BH3-Only Proteins--Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell* 103: 839-842.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D. & MacPherson, G. G. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 435-444.
- Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, A., Luecke, H., Romisch, J. & Paques, E. 1992. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J.Mol.Biol.* 223: 683-704.
- Huber, R., Romisch, J. & Paques, E. P. 1990. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J.* 9: 3867-3874.
- Hugues, S., Mougneau, E., Ferlin, W., Jeske, D., Hofman, P., Homann, D., Beaudoin, L., Schrike, C., Von Herrath, M., Lehuen, A. & Glaichenhaus, N. 2002. Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity.* 16: 169-181.
- Huynh, M. L., Fadok, V. A. & Henson, P. M. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J.Clin.Invest* 109: 41-50.
- Ignatowicz, L., Kappler, J. & Marrack, P. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84: 521-529.
- Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M. & Steinman, R. M. 1990. Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int.Rev.Immunol.* 6: 197-206.
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S. & Ikehara, S. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* 180: 1849-1860.
- Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, N., Mellman, I. & Steinman, R. M. 1998. Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Products of Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 188: 2163-2173.
- Ip, W. K. & 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.

- Ishimoto, Y., Ohashi, K., Mizuno, K. & Nakano, T. 2000. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J.Biochem.(Tokyo)* 127: 411-417.
- Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. & Graham, N. M. H. 1997. Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. *Clinical Immunology and Immunopathology* 84: 223-243.
- Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol.Today* 13: 11-16.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20: 197-216.
- Janeway, C. A. 2001. Immunobiology 5 : the immune system in health and disease. New York : Garland ; [Bethesda, MD : NCBI], 2001.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. & Porter, A. G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J.Biol.Chem.* 273: 9357-9360.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & 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. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1213-1222.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A. & Caton, A. J. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2: 301-306.
- Kaetzel, M. A., Hazarika, P. & Dedman, J. R. 1989. Differential tissue expression of three 35-kDa annexin calcium- dependent phospholipid-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 264: 14463-14470.
- 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. & Fadeel, B. 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.
- Kang, S. A., Cho, Y. J., Moon, H. B. & Na, D. S. 1996. Translocation of lipocortin (annexin) 1 to the membrane of U937 cells induced by phorbol ester, but not by dexamethasone. *Br.J.Pharmacol.* 117: 1780-1784.
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J.Immunol.* 123: 1548-1550.

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26: 239-257.
- Kiefer, C. R. & Snyder, L. M. 2000. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr.Opin.Hematol.* 7: 113-116.
- Kim, S. J., Gershov, D., Ma, X., Brot, N. & Elkon, K. B. 2002. I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655-665.
- King, K. L. & Cidlowski, J. A. 1998. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 60: 601-617.
- Kirsch, T., Swoboda, B. & Nah, H. 2000. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis.Cartilage.* 8: 294-302.
- Kishimoto, H., Surh, C. D. & Sprent, J. 1995. Upregulation of surface markers on dying thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 649-655.
- Klas, C., Debatin, K. M., Jonker, R. R. & Krammer, P. H. 1993. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int.Immunol.* 5: 625-630.
- Kohler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Korb, L. C. & Ahearn, J. M. 1997. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J.Immunol.* 158: 4525-4528.
- Krammer, P. H. 1998. The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol.Lett.* 102-103: 131-137.
- Krammer, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J. & Debatin, K. M. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr.Opin.Immunol.* 6: 279-289.
- Krammer, P. H. & Debatin, K. M. 1992. When apoptosis fails. *Curr.Biol.* 2: 383-385.
- Kurts, C., Sutherland, R. M., Davey, G., Li, M., Lew, A. M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J. F. & Heath, W. R. 1999. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 12703-12707.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M. & Wesselborg, S. 2004. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol.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., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G. & Wesselborg, S. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113: 717-730.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death.Differ.* 10: 144-145.
- Le, C., V, Russo-Marie, F. & Maridonneau-Parini, I. 1992. Differential expression of two forms of annexin 3 in human neutrophils and monocytes and along their differentiation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189: 1471-1476.
- Leenen, P. J. M., Radosevic, K., Voerman, J. S. A., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D. & van Ewijk, W. 1998. Heterogeneity of Mouse Spleen Dendritic Cells: In Vivo Phagocytic Activity, Expression of Macrophage Markers, and Subpopulation Turnover. *The Journal of Immunology* 160: 2166-2173.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S. & Nicotera, P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp.Cell Res.* 249: 396-403.
- Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R. M. & Beg, A. A. 2001a. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J.Immunol.* 166: 7128-7135.
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P. & Flavell, R. A. 2003. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302: 1560-1563.
- Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R. & Heath, W. R. 2001b. Cell-Associated Ovalbumin Is Cross-Presented Much More Efficiently than Soluble Ovalbumin In Vivo. *The Journal of Immunology* 166: 6099-6103.
- Liang, S., Alard, P., Zhao, Y., Parnell, S., Clark, S. L. & Kosiewicz, M. M. 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 127-137.
- Licht, R., Dieker, J. W., Jacobs, C. W., Tax, W. J. & Berden, J. H. 2004. Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice. *J.Autoimmun.* 22: 139-145.
- Ling, Q., Jacovina, A. T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R. L., Hempstead, B., Mark, W. H. & Hajjar, K. A. 2004. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 113: 38-48.
- Liu, G. Y., Fairchild, P. J., Smith, R. M., Prowle, J. R., Kioussis, D. & Wraith, D. C. 1995a. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity.* 3: 407-415.

- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K. & Steinman, R. M. 2002a. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 1091-1097.
- Liu, L., Fisher, A. B. & Zimmerman, U. J. 1995b. Regulation of annexin I by proteolysis in rat alveolar epithelial type II cells. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 36: 373-381.
- Liu, S. H., Lin, C. Y., Peng, S. Y., Jeng, Y. M., Pan, H. W., Lai, P. L., Liu, C. L. & Hsu, H. C. 2002b. Down-Regulation of Annexin A10 in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Vascular Invasion, Early Recurrence, and Poor Prognosis in Synergy with p53 Mutation. *American Journal of Pathology* 160: 1831-1837.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. 2003. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 4: 664-669.
- Lutz, M. B. & Schuler, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23: 445-449.
- Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J. & Rao, A. 2004. T-cell anergy. *Curr.Opin.Immunol.* 16: 209-216.
- Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H. & Jonuleit, H. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 80: 477-483.
- Maldonado-Lopez, R. & Moser, M. 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Seminars in Immunology* 13: 275-282.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S. & Michalek, S. M. 2005. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6: 777-784.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. & Green, D. R. 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. *The Journal of Experimental Medicine* 182: 1545-1556.
- Masaki, T., Tokuda, M., Fujimura, T., Ohnishi, M., Tai, Y., Miyamoto, K., Itano, T., Matsui, H., Watanabe, S., Sogawa, K. & . 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.
- Masse, D., Ebstein, F., Bougras, G., Harb, J., Meflah, K. & Gregoire, M. 2004. Increased expression of inducible HSP70 in apoptotic cells is correlated with their efficacy for antitumor vaccine therapy. *Int.J.Cancer* 111: 575-583.

- Massey-Harroche, D., Mayran, N. & Maroux, S. 1998. Polarized localizations of annexins I, II, VI and XIII in epithelial cells of intestinal, hepatic and pancreatic tissues. *Journal of Cell Science* 111: 3007-3015.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu.Rev.Immunol.* 12: 991-1045.
- Mayran, N., Parton, R. G. & Gruenberg, J. 2003. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *The EMBO Journal* 22: 3242-3253.
- Mekala, D. J., Alli, R. S. & Geiger, T. L. 2005. IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 11817-11822.
- Menges, M., ner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G. & Lutz, M. B. 2001. Repetitive Injections of Dendritic Cells Matured with Tumor Necrosis Factor {alpha} Induce Antigen-specific Protection of Mice from Autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 195: 15-22.
- Merrifield, C. J., Rescher, U., Almers, W., Proust, J., Gerke, V., Sechi, A. S. & Moss, S. E. 2001. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Current Biology* 11: 1136-1141.
- Merril, C. R. & Pratt, M. E. 1986. A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal.Biochem.* 156: 96-110.
- Mishima, Y. 1966. Melanosomes in phagocytic vacuoles in Langerhans cells: Electron Microscopy of Keratin-Stripped Human Epidermis. *The Journal of Cell Biology* 30: 417-423.
- Miyachi, T., Asai, K., Tsuiki, H., Mizuno, H., Yamamoto, N., Yokoi, T., Aoyama, M., Togari, H., Wada, Y., Miura, Y. & Kato, T. 2001. Interleukin-1beta induces the expression of lipocortin 1 mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci.Res.* 40: 53-60.
- Mizutani, A., Tokumitsu, H., Kobayashi, R. & Hidaka, H. 1993. Phosphorylation of annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 268: 15517-15522.
- Moffatt, O. D., Devitt, A., Bell, E. D., Simmons, D. L. & 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. & Holdsworth, S. R. 1995. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 76: 195-202.
- Moreno, J. J. 1996. Antiflammin-2, a nonapeptide of lipocortin-1, inhibits leukocyte chemotaxis but not arachidonic acid mobilization. *Eur.J.Pharmacol.* 314: 129-135.

- Moreno, J. J. 2000. Antiflammin peptides in the regulation of inflammatory response. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 923: 147-153.
- Morgan, D. J., Kreuwel, H. T. & Sherman, L. A. 1999. Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J.Immunol.* 163: 723-727.
- Morgan, R. O. & Fernandez, M. P. 1995. A BC200-derived element and Z-DNA as structural markers in annexin I genes: relevance to Alu evolution and annexin tetrad formation. *J.Mol.Evol.* 41: 979-985.
- Morgan, R. O. & Fernandez, M. P. 1998. Expression profile and structural divergence of novel human annexin 31. *FEBS Letters* 434: 300-304.
- Moss, S. & Morgan, R. 2004. The annexins. *Genome Biology* 5: 219.
- Movitz, C. & Dahlgren, C. 2000. Endogenous cleavage of annexin I generates a truncated protein with a reduced calcium requirement for binding to neutrophil secretory vesicles and plasma membrane. *Biochim.Biophys.Acta* 1468: 231-238.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. & Krammer, P. H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J.Exp.Med.* 188: 2033-2045.
- Naciff, J. M., Kaetzel, M. A., Behbehani, M. M. & Dedman, J. R. 1996. Differential expression of annexins I-VI in the rat dorsal root ganglia and spinal cord. *J.Comp Neurol.* 368: 356-370.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H. & Strober, W. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *The Journal of Immunology* 172: 834-842.
- Nguyen, V. T., Ndoye, A. & Grando, S. A. 2000. Pemphigus Vulgaris Antibody Identifies Pemphaxin. A novel keratinocyte Annexin-like molecule binding acetylcholine. *Journal of Biological Chemistry* 275: 29466-29476.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & 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.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. & Henson, P. M. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 194: 781-795.
- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M. & 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., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T. & Masaki, T. 1998. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 9535-9540.
- Okada, H. & Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat.Rev.Cancer* 4: 592-603.
- Oppenheim, R. W. 1991. Cell Death During Development of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience* 14: 453-501.
- Ortega, D., Pol, A., Biermer, M., Jackle, S. & Enrich, C. 1998. Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *Journal of Cell Science* 111: 261-269.
- Oudinet, J. P., Russo-Marie, F., Cavadore, J. C. & Rothhut, B. 1993. Protein kinase C-dependent phosphorylation of annexins I and II in mesangial cells. *Biochem.J.* 292 ( Pt 1): 63-68.
- Palmer, E. 2003. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 3: 383-391.
- Parnaik, R., Raff, M. C. & Scholes, J. 2000. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr.Biol.* 10: 857-860.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 14: 123-128.
- Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J. G., Goulding, N. J. & Flower, R. J. 1993. Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse. A qualitative comparison with an anti-CD11b monoclonal antibody. *J.Immunol.* 151: 4306-4314.
- Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J. G., Harris, H. J., Wheller, S. K. & Flower, R. J. 1996. Acute inflammatory response in the mouse: exacerbation by immunoneutralization of lipocortin 1. *Br.J.Pharmacol.* 117: 1145-1154.
- Perretti, M. & Flower, R. J. 1993. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J.Immunol.* 150: 992-999.
- Perretti, M. & Flower, R. J. 2004. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. *J.Leukoc.Biol.* 76: 25-29.
- Perretti, M. & Gavins, F. N. 2003. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci.* 18: 60-64.
- Perretti, M., Wheller, S. K., Choudhury, Q., Croxtall, J. D. & Flower, R. J. 1995. Selective inhibition of neutrophil function by a peptide derived from lipocortin 1 N-terminus. *Biochem.Pharmacol.* 50: 1037-1042.
- Peter, M. E. & Krammer, P. H. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.* 10: 26-35.



- Petrie, H. T., Hugo, P., Scollay, R. & Shortman, K. 1990. Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* 172: 1583-1588.
- Philip, J. G., Flower, R. J. & Buckingham, J. C. 1998. Blockade of the classical pathway of protein secretion does not affect the cellular exportation of lipocortin 1. *Regul.Pept.* 73: 133-139.
- Pietra, G., Mortarini, R., Parmiani, G. & Anichini, A. 2001. Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells. *Cancer Res.* 61: 8218-8226.
- Platt, N., da Silva, R. P. & Gordon, S. 1999. Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol.Lett.* 65: 15-19.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B. & Coffman, R. L. 1993. Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int.Immunol* 5: 1461-1471.
- Pradhan, D., Krahling, S., Williamson, P. & Schlegel, R. A. 1997. Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Mol.Biol.Cell* 8: 767-778.
- Pulvertaft, J. V. 1964. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* 39: 238-240.
- Quartier, P., Potter, P. K., Ehrenstein, M. R., Walport, M. J. & Botto, M. 2005. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur.J.Immunol.* 35: 252-260.
- Ralph, P., Saiki, O., Maurer, D. H. & Welte, K. 1983. IgM and IgG secretion in human B-cell lines regulated by B-cell-inducing factors (BIF) and phorbol ester. *Immunol.Lett.* 7: 17-23.
- Ramirez, F. & Rifkin, D. B. 2003. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biology* 22: 101-107.
- 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. M., Fauvel, J. & 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 ( Pt 3): 759-765.
- Raynal, P. & Pollard, H. B. 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1197: 63-93.
- Read, S., Mauze, S., Asseman, C., Bean, A., Coffman, R. & Powrie, F. 1998. CD38<sup>+</sup> CD45RB(low) CD4<sup>+</sup> T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur.J Immunol* 28: 3435-3447.

Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J. & Savill, J. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 1857-1862.

Reutelingsperger, C. P. M., van Heerde, W., Hauptmann, R., Maassen, C., van Gool, R. G. J., de Leeuw, P. & Tiebosch, A. 1994. Differential tissue expression of Annexin VIII in human. *FEBS Letters* 349: 120-124.

Rhee, H. J., Kim, G. Y., Huh, J. W., Kim, S. W. & Na, D. S. 2000. Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *Eur.J.Biochem.* 267: 3220-3225.

Robey, E. & Fowlkes, B. J. 1994. Selective events in T cell development. *Annu.Rev.Immunol.* 12: 675-705.

Rock, K. L., Hearn, A., Chen, C. J. & Shi, Y. 2005. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin.Immunopathol.* 26: 231-246.

Rosen, A. & Casciola-Rosen, L. 1999. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death.Differ.* 6: 6-12.

Rosen, A. & Casciola-Rosen, L. 2001. Clearing the way to mechanisms of autoimmunity. *Nat.Med.* 7: 664-665.

Rosengarth, A. & Luecke, H. 2003. A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J.Mol.Biol.* 326: 1317-1325.

Rothman, J. E. & Lenard, J. 1977. Membrane asymmetry. *Science* 195: 743-753.

Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M. & Karjalainen, K. 2000. Anatomical Origin of Dendritic Cells Determines Their Life Span in Peripheral Lymph Nodes. *The Journal of Immunology* 165: 4910-4916.

Russo, V., Tanzarella, S., Dalerba, P., Rigatti, D., Rovere, P., Villa, A., Bordignon, C. & Traversari, C. 2000. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 2185-2190.

Sakaguchi, S. 2004. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 22: 531-562.

Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine* 179: 1109-1118.

Salzer, U., Hinterdorfer, P., Hunger, U., Borken, C. & Prohaska, R. 2002. Ca<sup>++</sup>-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 99: 2569-2577.

- Sato-Matsumura, K. C., Matsumura, T., Nakamura, H., Sawa, H., Nagashima, K. & Koizumi, H. 2000. Membrane expression of annexin I is enhanced by calcium and TPA in cultured human keratinocytes. *Arch.Dermatol.Res.* 292: 496-499.
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat.Rev.Immunol.* 2: 965-975.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P. & Haslett, C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol.Today* 14: 131-136.
- Scaffidi, C., Kirchhoff, S., Krammer, P. H. & Peter, M. E. 1999a. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.* 11: 277-285.
- Scaffidi, C., Krammer, P. H. & Peter, M. E. 1999b. Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex. *Methods* 17: 287-291.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-195.
- Scarlett, J. L., Sheard, P. W., Hughes, G., Ledgerwood, E. C., Ku, H. H. & Murphy, M. P. 2000. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Letters* 475: 267-272.
- Scheffer, S. R., Nave, H., Korangy, F., Schlote, K., Pabst, R., Jaffee, E. M., Manns, M. P. & Greten, T. F. 2003. Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int.J.Cancer* 103: 205-211.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* 97: 695-710.
- Schlegel, R. A. & Williamson, P. 2001. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death.Differ.* 8: 551-563.
- Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S. C., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. 2004. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J.Immunol.* 172: 2194-2200.
- Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int.J.Cancer* 19: 621-626.
- Scholzen, T. E. & Luger, T. A. 2004. Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme -- key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. *Exp.Dermatol.* 13 Suppl 4: 22-26.

Schulz, O. & Reis e Sousa, C. 2002. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8<sup>+</sup> dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107: 183-189.

Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annual Review of Immunology* 21: 305-334.

Scoltock, A. B. & Cidlowski, J. A. 2004. Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition. *Experimental Cell Research* 297: 212-223.

Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R. G. & Gerke, V. 1996. The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca<sup>2+</sup> and requires an intact N-terminal domain. *Molecular Biology of the Cell* 7: 1359-1374.

Seigneuret, M. & Devaux, P. F. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81: 3751-3755.

Selbert, S., Fischer, P., Pongratz, D., Stewart, M. & Noegel, A. A. 1995. Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *Journal of Cell Science* 108: 85-95.

Sheriff, A., Gaipal, U. S., Voll, R. E., Kalden, J. R. & Herrmann, M. 2004. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 30: 505-516.

Shi, J., Gilbert, G. E., Kokubo, Y. & Ohashi, T. 2001. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 98: 1226-1230.

Shi, Y., Evans, J. E. & Rock, K. L. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521.

Shi, Y. & Rock, K. L. 2002. Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens. *Eur.J.Immunol.* 32: 155-162.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. & Scollay, R. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin.Immunol.* 2: 3-12.

Skoberne, M., Beignon, A. S., Larsson, M. & Bhardwaj, N. 2005. Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol* 289: 259-292.

Skouteris, G. G. & 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., de Coupade, C., Parente, L., Flower, R. J. & Russo-Marie, F. 1998. IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein. *Cytokine* 10: 514-521.

Solito, E., Nuti, S. & Parente, L. 1994. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *Br.J.Pharmacol.* 112: 347-348.

- Solovyan, V. T. & Keski-Oja, J. 2005. Apoptosis of human endothelial cells is accompanied by proteolytic processing of latent TGF- $\beta$  binding proteins and activation of TGF- $\beta$ . *J. Cell Physiol* 12: 815-826.
- Spreca, A., Rambotti, M. G., Giambanco, I., Pula, G., Bianchi, R., Ceccarelli, P. & Donato, R. 1992. Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart. *J. Cell Physiol* 152: 587-598.
- Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2: 185-194.
- Stach, C. M., Turnay, X., Voll, R. E., Kern, P. M., Kolowos, W., Beyer, T. D., Kalden, J. R. & Herrmann, M. 2000. Treatment with annexin V increases immunogenicity of apoptotic human T-cells in Balb/c mice. *Cell Death Differ.* 7: 911-915.
- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A. H. 2002. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99: 2468-2476.
- Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 351-358.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 411-416.
- Steinman, R. M. & Witmer, M. D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75: 5132-5136.
- Stern, M., Savill, J. & Haslett, C. 1996. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am. J. Pathol.* 149: 911-921.
- Stowe, R. P., Sams, C. F., Mehta, S. K., Kaur, I., Jones, M. L., Feedback, D. L. & Pierson, D. L. 1999. Leukocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* 65: 179-186.
- Struyf, S., Proost, P. & Van Damme, J. 2003. Regulation of the immune response by the interaction of chemokines and proteases. *Adv. Immunol.* 81: 1-44.
- Stuart, L. M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J. & 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. & Ezekowitz, R. A. 2005. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J. Immunol.* 174: 3220-3226.

- Sudlow, A. W., Carey, F., Forder, R. & Rothwell, N. J. 1996. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE2 and TNF alpha release from human peripheral blood mononuclear cells. *Br.J.Pharmacol.* 117: 1449-1456.
- Sundstrom, C. & Nilsson, K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int.J.Cancer* 17: 565-577.
- Surh, C. D. & Sprent, J. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372: 100-103.
- Swairjo, M. A. & Seaton, B. A. 1994. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 23: 193-213.
- Takizawa, F., Tsuji, S. & Nagasawa, S. 1996. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett.* 397: 269-272.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. & Tomita, F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 135: 397-402.
- Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. & Williamson, P. 1996. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272: 1495-1497.
- Taylor, P. R., Carugati, A., Fadok, V. A., Cook, H. T., Andrews, M., Carroll, M. C., Savill, J. S., Henson, P. M., Botto, M. & Walport, M. J. 2000. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 359-366.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D. & Gordon, S. 2005. MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology* 23: 901-944.
- Thornton, A. M. & Shevach, E. M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp.Med.* 188: 287-296.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. & Krammer, P. H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305.
- Traverso, V., Christian, H. C., Morris, J. F. & Buckingham, J. C. 1999. Lipocortin 1 (annexin 1): a candidate paracrine agent localized in pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 140: 4311-4319.
- Trombetta, E. S. & Mellman, I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu.Rev.Immunol.* 23: 975-1028.
- Tyurina, Y. Y., Serinkan, F. B., Tyurin, V. A., Kini, V., Yalowich, J. C., Schroit, A. J., Fadeel, B. & Kagan, V. E. 2004. Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation. *J.Biol.Chem.* 279: 6056-6064.

- van de Wetering, J. K., van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. 2004. Collectins. Players of the innate immune system. *European Journal of Biochemistry* 271: 1229-1249.
- van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Baehrecke, E. H., De Zeeuw, C. I., Reutelingsperger, C. P. & Vermeij-Keers, C. 1998. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis*. 3: 9-16.
- van Leeuwen, J. E. & Samelson, L. E. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr.Opin.Immunol.* 11: 242-248.
- 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. & 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.
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. 1999. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben Tal, O., Kutikov, I., Gill, O. & 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. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 1553-1561.
- Verginis, P., Li, H. S. & Carayanniotis, G. 2005. Tolerogenic Semimature Dendritic Cells Suppress Experimental Autoimmune Thyroiditis by Activation of Thyroglobulin-Specific CD4+CD25+ T Cells. *The Journal of Immunology* 174: 7433-7439.
- Verhoven, B., Krahlting, S., Schlegel, R. A. & Williamson, P. 1999. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death.Differ.* 6: 262-270.
- Verhoven, B., Schlegel, R. A. & Williamson, P. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 182: 1597-1601.
- Visser, J., Boxel-Dezaire, A., Methorst, D., Brunt, T., de Kloet, E. R. & Nagelkerken, L. 1998. Differential Regulation of Interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by Glucocorticoids In Vitro. *Blood* 91: 4255-4264.
- Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A. B., Chisari, F. V., Buerki, K. & Pircher, H. 2000. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J.Immunol.* 165: 2415-2422.
- Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (*Alytes obstetricians*). 1842. Jent & Gassmann, Solothurn.  
Ref Type: Generic
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J. P., Cottrez, F. & Groux, H. 2003. Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity* 18: 605-617.

- Waldner, H., Collins, M. & Kuchroo, V. K. 2004. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *Journal of Clinical Investigation* 113: 990-997.
- Walker, L. S. K., Chodos, A., Eggena, M., Doms, H. & Abbas, A. K. 2003. Antigen-dependent Proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 249-258.
- Wallner, B. P., Mattaliano, R. J., Hession, C., Cate, R. L., Tizard, R., Sinclair, L. K., Foeller, C., Chow, E. P., Browing, J. L., Ramachandran, K. L. & . 1986. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* 320: 77-81.
- Walther, A., Riehemann, K. & Gerke, V. 2000. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol.Cell* 5: 831-840.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. & Nussenzweig, M. C. 2003. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. *Science* 301: 1374-1377.
- Waring, P., Lambert, D., Sjaarda, A., Hurne, A. & Beaver, J. 1999. Increased cell surface exposure of phosphatidylserine on propidium iodide negative thymocytes undergoing death by necrosis. *Cell Death.Differ.* 6: 624-637.
- Wiegand, U. K., Corbach, S., Prescott, A. R., Savill, J. & Spruce, B. A. 2001. The trigger to cell death determines the efficiency with which dying cells are cleared by neighbours. *Cell Death.Differ.* 8: 734-746.
- Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R. A. & Devaux, P. F. 1992. Ca<sup>2+</sup> induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31: 6355-6360.
- Williamson, P. & Schlegel, R. A. 2002. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1585: 53-63.
- Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R. & Martin, P. 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127: 5245-5252.
- Wucherpfennig, K. W. 2001. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *Journal of Clinical Investigation* 108: 1097-1104.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 68: 251-306.
- Yang, Y., Hutchinson, P. & Morand, E. F. 1999. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 1538-1544.
- Yang, Y., Leech, M., Hutchinson, P., Holdsworth, S. R. & Morand, E. F. 1997. Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation* 21: 583-596.



Zerrahn, J., Held, W. & Raulet, D. H. 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 88: 627-636.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.



SBC22306B-0678-37D9C965

Reprints of our posters at the 48th ASMS Conference are available in PDF format ([ThPB096](#), [ThPB097](#)).

## ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search BC22306B-0678-37D9C965 [860909 sequences searched]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	Ⓢ
+1	1.0e+000	2.35	τ <a href="#">gi 4502101 ref NP_000691.1 </a> (NM_000700) annexin I; annexin I (lipocortin I); lipocortin I [Homo sapiens]	59	6.6	38.92	Ⓢ
	-	-	τ <a href="#">gi 442631 pdb 1AIN </a> Annexin I	52	7.9	35.25	Ⓢ
	-	-	τ <a href="#">gi 1703316 sp P51662 ANX1_RABIT</a> Annexin I (Lipocortin I) (Calpactin II) (Chromobindin 9) (P35) (Phospholipase A2 inhibitory protein)	26	6.3	39.00	Ⓢ
	-	-	τ <a href="#">gi 235879 gb AAB19866.1 </a> (S57478) lipocortin I [Rattus sp.]	22	7.0	39.14	Ⓢ
	-	-	τ <a href="#">gi 6978501 ref NP_037036.1 </a> (NM_012904) annexin I (p35) (Lipocortin I); annexin A1 [Rattus norvegicus]	22	7.0	39.15	Ⓢ
2	9.5e-024	-	τ <a href="#">gi 15642373 ref NP_232006.1 </a> (NC_002505) glutamate synthase, large subunit [Vibrio cholerae]	10	5.9	164.51	Ⓢ
+3	1.3e-025	-	τ <a href="#">gi 438508 gb AAA87363.1 </a> (L20446) RNA-directed RNA polymerase [Bluetongue virus 13]	12	9.1	150.40	Ⓢ
4	6.7e-026	-	τ <a href="#">gi 15964146 ref NP_384499.1 </a> (NC_003047) CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN [Sinorhizobium meliloti]	28	6.1	32.82	Ⓢ
5	5.7e-026	-	τ <a href="#">gi 16801079 ref NP_471347.1 </a> (NC_003212) similar to ATP-dependent helicases [Listeria innocua]	13	5.8	106.03	Ⓢ
6	2.0e-026	-	τ <a href="#">gi 19173110 ref NP_597661.1 </a> (NC_003230) similarity to HELICASE MOT1 [Encephalitozoon cuniculi]	9	6.0	145.27	Ⓢ
7	1.2e-026	-	τ <a href="#">gi 10435509 dbj BAB14604.1 </a> (AK023544) unnamed protein product [Homo sapiens]	14	9.1	76.29	Ⓢ
8	8.1e-027	-	τ <a href="#">gi 11498158 ref NP_069384.1 </a> (NC_000917) threonyl-tRNA synthetase (thrS) [Archaeoglobus fulgidus]	15	5.8	72.42	Ⓢ
+9	7.9e-027	-	τ <a href="#">gi 3851586 gb AAC72361.1 </a> (AF092564) chromosome-associated protein-C [Homo sapiens]	10	6.6	138.73	Ⓢ
10	6.6e-027	-	τ <a href="#">gi 93915 pir A39927</a> RNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.48) - murine hepatitis virus (strain MHV-A59 defective interfering particle) (fragment)	10	4.7	132.46	Ⓢ

## NOTE:

- To search again using unmatched masses, click the symbol Ⓢ.
- Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "\*" to expand/contract).

## Input Summary

Date &amp; Time Fri Aug 23 05:33:40 2002 UTC (Search Time: 23.92 sec.)

Sample ID HW771\_1

Database NCBIInr (2002/03/29)

Taxonomy Category All-taxa

Protein Mass Range 0 - 200 kDa

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 1

Modifications +C2H3ON@C(Complete); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses  
(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

Peptide Masses 763.390 908.450 966.520 982.510 1054.590 1092.650 1158.700 1213.580 1262.610 1339.580 1371.750  
(Da,Monoisotopic) 1387.690 1543.810 1550.760 1605.870 1627.850 1678.840 1702.820 1724.770 1739.680 1741.740 1904.980  
2067.830 2123.970 2140.990 2155.960 2162.990 2172.980 2244.150 2284.270 2334.080 2356.140

Tolerance(MON) 100.00 ppm

Number of Peptides 32

This ProFound is made available to public through the courtesy of ProteoMetrics. [search + transmission time: &gt;=24.08 sec]

**Zusammenfassung der Resultate aus der Datenbanksuche.** Die Ergebnisse der Datenbanksuche sind oben angegeben. An oberster Stelle steht Annexin I als Protein mit der höchsten Übereinstimmung im Vergleich zu den eingegebenen Peptid-Massen. Unten sind die eingegebenen Parameter und Peptidmassen aufgeführt.

Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Error (ppm)	Residues Start	To	Missed Cut	Peptide sequence
762.372	M	762.402	-39	229	234	0	SYPQLR
907.462	M	907.439	25	205	212	0	ALYEAGER
1063.562	M	1063.485	73	304	312	0	SEIDMNDIK
1063.562	M	1063.541	20	205	213	1	ALYAGERR
1212.572	M	1212.639	-55	282	292	1	LHQAMKGVGTR
1212.572	M	1212.525	39	167	177	0	DITSDTSGDFR
1261.592	M	1261.593	-1	114	124	0	TPAQFDADLR
1355.622	M	1355.654	-23	270	281	0	CATSKPAFFAEK
1370.732	M	1370.765	-24	251	262	1	VLDLELKGDIK
1386.742	M	1386.760	-13	59	71	0	GVDEATIIDLTK
1542.802	M	1542.861	-38	59	72	1	GVDEATIIDLTKR
1549.742	M	1549.809	-43	215	228	0	GTDVNVFNTILTR
1639.702	M	1639.768	-40	163	177	1	DLAKDITSDTSGDFR
1677.842	M	1677.904	-37	214	228	1	KGTDVNVFNTILTR
1701.822	M	1701.878	-33	129	144	0	GLGTDEDTLIEILASR
1738.672	M	1738.728	-32	189	204	0	SEDFGVNEDLADSDAR
1775.882	M	1775.930	-27	82	97	0	AAYLQETGKPLDETLK
1903.992	M	1904.024	-17	82	98	1	AAYLQETGKPLDETLK
2066.862	M	2066.877	-7	186	204	1	GDRSEDFGVNEDLADSDAR
2140.012	M	2140.010	1	10	26	0	QAWFIENEQYVQTVK
2333.112	M	2333.091	9	318	337	1	MYGISLCQAILEDKGDYK
2355.172	M	2355.148	10	30	53	0	GGPGSAVSFYPTFNPSSDVAALHK

**Unmatched Monoisotopic Masses:**

966.510 982.500 1092.660 1218.630 1339.600 1834.970 2051.990 2124.000 2157.010 2163.080 2173.030 2418.050

Search again using unmatched masses:

**Sequenzen der identifizierten Peptide.** Die handschriftlich markierten Sequenzen wurden von Dr. M. Schnölzer mit der veröffentlichten Aminosäure-Sequenz für Annexin I abgeglichen.



SBDA4CF6A-04DC-3975CB01

Reprints of our posters at the 48th ASMS Conference are available in PDF format ([ThPB096](#), [ThPB097](#)).

## ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search BDA4CF6A-04DC-3975CB01 [181659 sequences searched]

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	Ⓢ
+1	1.0e+000	2.38	T <a href="#">gil4502101 ref NP_000691.1 </a> (NM_000700) annexin I; annexin I (lipocortin I); lipocortin I [Homo sapiens]	60	6.6	38.92	Ⓢ
			T <a href="#">gil442631 pdb 1AIN </a> Annexin I	53	7.9	35.25	Ⓢ
			T <a href="#">gil6978501 ref NP_037036.1 </a> (NM_012904) annexin 1 (p35) (Lipocortin 1); annexin A1 [Rattus norvegicus]	23	7.0	39.15	Ⓢ
			T <a href="#">gil235879 gb AAB19866.1 </a> (S57478) lipocortin I [Rattus sp.]	23	7.0	39.14	Ⓢ
			T <a href="#">gil1703316 sp P51662 ANX1_RABBIT</a> Annexin I (Lipocortin I) (Calpactin II) (Chromobindin 9) (P35) (Phospholipase A2 inhibitory protein)	18	6.3	39.00	Ⓢ
			T <a href="#">gil387403 gb AAA39420.1 </a> (M24554) lipocortin I protein [Mus musculus]	14	7.9	38.55	Ⓢ
			T <a href="#">gil113945 sp P10107 ANX1_MOUSE</a> Annexin I (Lipocortin I) (Calpactin II) (Chromobindin 9) (P35) (Phospholipase A2 inhibitory protein)	14	7.0	39.00	Ⓢ
			T <a href="#">gil6729710 pdb 1BO9 A</a> Chain A, Nmr Solution Structure Of Domain 1 Of Human Annexin I	42	8.0	7.99	Ⓢ
			T <a href="#">gil6754570 ref NP_034860.1 </a> (NM_010730) lipocortin I [Mus musculus]	12	6.6	38.96	Ⓢ
2	5.6e-031		T <a href="#">gil16124253 gb AAA83442.2 </a> (U32577) M4 protein [Rattus norvegicus]	21	9.2	74.86	Ⓢ
3	1.1e-031		T <a href="#">gil7447160 pir JCS807</a> trp3 protein - rat	9	6.8	95.70	Ⓢ
+4	3.7e-032		T <a href="#">gil442605 pdb 1ABBI A</a> Chain A, Glycogen Phosphorylase (E.C.2.4.1.1) Complex With Pyridoxal-5'-Diphosphate	11	7.0	96.03	Ⓢ
+5	6.6e-033		T <a href="#">gil13642779 ref XP_017394.1 </a> (XM_017394) Arg/Abl-interacting protein 2, isoform 1 [Homo sapiens]	14	8.7	70.00	Ⓢ
+6	3.0e-033		T <a href="#">gil6978485 ref NP_037329.1 </a> (NM_013197) aminolevulinate synthase 2, delta [Rattus norvegicus]	18	9.0	65.62	Ⓢ
+7	1.9e-033		T <a href="#">gil16188971 ref XP_007175.4 </a> (XM_007175) hypothetical protein XP_007175 [Homo sapiens]	7	9.1	148.07	Ⓢ
+8	9.5e-034		T <a href="#">gil16904134 gb AAL30771.1 AF434816_1</a> (AF434816) fring [Homo sapiens]	17	5.3	41.75	Ⓢ
+9	7.4e-034		T <a href="#">gil10947124 ref NP_064694.1 </a> (NM_020298) ATP-binding cassette, sub-family C, member 9, isoform SUR2A-delta-14; sulfonylurea receptor 2A [Homo sapiens]	7	6.7	171.39	Ⓢ
+10	5.8e-034		T <a href="#">gil6755058 ref NP_035213.1 </a> (NM_011083) phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha polypeptide [Mus musculus]	7	8.7	172.47	Ⓢ

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol Ⓢ.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "\*" to expand/contract).

## Input Summary

**Date & Time** Wed Sep 11 11:40:46 2002 UTC (Search Time: 5.27 sec.)  
**Sample ID** HW776\_2  
**Database** NCBI nr (2002/03/29)  
**Taxonomy Category** Mammalia (mammals)  
**Protein Mass Range** 0 - 200 kDa  
**Protein pI Range** 0.0 - 14.0  
**Search for** Single protein only  
**Digest Chemistry** Trypsin  
**Max Missed Cut** 1  
**Modifications** +C2H3ON@C(Complete); +O@M(Partial);  
**Charge State** MH+  
**Peptide Masses (Da, Average)**  
**Tolerance(AVG)** 1.00 ppm  
**Peptide Masses (Da, Monoisotopic)** 763.380 908.470 966.510 982.500 1064.570 1092.660 1213.580 1218.630 1262.600 1339.600 1356.630  
1371.740 1387.750 1543.810 1550.750 1640.710 1678.850 1702.830 1739.680 1776.890 1834.970 1905.000  
2051.990 2067.870 2124.000 2141.020 2157.010 2163.080 2173.030 2334.120 2356.180 2418.050  
**Tolerance(MON)** 100.00 ppm  
**Number of Peptides** 32

This ProFound is made available to public through the courtesy of [ProteoMetrics](#). [search + transmission time: >=5.58 sec]

**Zusammenfassung der Resultate aus der Datenbanksuche.** Die Ergebnisse der Datenbanksuche sind oben angegeben. An oberster Stelle steht Annexin I als Protein mit der höchsten Übereinstimmung im Vergleich zu den eingegebenen Peptid-Massen. Unten sind die eingegebenen Parameter und Peptidmassen aufgeführt.

Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Error (ppm)	Residues Start	To	Missed Cut	Peptide sequence
762.382	M	762.402	-26	229	234	0	SYPQLR - - PSD ✓
907.442	M	907.439	3	205	212	0	ALYEAGER
1212.572	M	1212.639	-55	282	292	1	<del>LHQANKVCTR</del>
1212.572	M	1212.525	39	167	177	0	DITSDTSGDFR
1261.602	M	1261.593	7	114	124	0	TPAQFDADELRL - PSD ✓
1370.742	M	1370.765	-17	251	262	1	VLDLELKGDIK
1386.682	M	1386.760	-56	59	71	0	GVDEATIIDLTK
1542.802	M	1542.861	-38	59	72	1	GVDEATIIDLTKR
1549.752	M	1549.809	-37	215	228	0	GTDVNVFNTILTR
1604.862	M	1604.949	-54	99	113	0	ALTGHLEEVVLALK
1677.832	M	1677.904	-43	214	228	1	KGTDVNVFNTILTR
1701.812	M	1701.878	-39	129	144	0	GLGTDEDTLIEILASR - PSD ✓
1738.672	M	1738.728	-32	189	204	0	SEDFGVNEDLADSDAR
1740.732	M	1740.842	-63	318	332	0	MYGISLCQAILDETK
1903.972	M	1904.024	-27	82	98	1	AAYLQETGKPLDETLKK
2066.822	M	2066.877	-26	186	204	1	GDRSEDFGVNEDLADSDAR
2139.982	M	2140.010	-13	10	26	0	QAWFIENEQEYVQTVK
2333.072	M	2333.091	-8	318	337	1	MYGISLCQAILDETRGDYK
2355.132	M	2355.148	-7	30	53	0	GGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALHK

**Unmatched Monoisotopic Masses:**

966.520 982.510 1054.590 1092.650 1158.700 1339.580 1627.850 1724.770 2123.970 2155.960 2162.990 2172.980 2244.150 2284.270

Search again using unmatched masses:

**Sequenzen der identifizierten Peptide.** Die handschriftlich markierten Sequenzen wurden von Dr. M. Schnölzer mit der veröffentlichten Aminosäure-Sequenz für Annexin I abgeglichen.

### 3. Abkürzungen

Anx	Annexin
ATP	Adenosin Triphosphat
BCA	Bichinonische Säure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>clusters of differentiation</i> / Nomenklatur zur Klassifizierung von Oberflächenmolekülen
CR	Komplement-Rezeptor
d	Tage
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonuclein-Säure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F(ab') <sub>2</sub>	Antigenbindendes Antikörper-Fragment (bivalent)
FACS	<i>fluorescence assisted cell scan</i> , Durchflusszytometer
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunden
HRP	<i>horseradish</i> Peroxidase
IL	Interleukin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption - time of flight</i>
M	Molar
MBL	Mannan-bindendes Lektin
MFG-E8	<i>milk fat</i> Globulin E8
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten



ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i> / Molekulargewichtsgrenze
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophoreses
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / Phosphatpuffer
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat
Poly (I:C)	Polyinosin-Polycytidyl-Säure
PS	Phosphatidylserin
PSR	Phosphatidylserin-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Sts	Staurosporin
TEC	Thymische Epitheliale Zellen
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Unit
UV-Strahlung	Ultraviolette-Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen Verhältnis
w/v	Gewicht zu Volumen Verhältnis

### 3. Publikationsverzeichnis

#### Originalveröffentlichungen

Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H. & Aguzzi, A. 2001. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat.Med.* 7: 488-492.

Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death.Differ.* 10: 144-145.

Schmitz, I., Weyd, H., Krueger, A., Baumann, S., Fas, S. C., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. 2004. Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort. *J.Immunol.* 172: 2194-2200.

#### 4. Lebenslauf

Name : Heiko Weyd  
Geburtsort,-datum: Hamburg, 12.04.1972  
Eltern: Holger Weyd, EDV-Organisator  
Marlies Weyd, geb. Benkner, Ärztin  
Geschwister: Daniela Schön, geb. Weyd  
Henning Weyd

#### Schule und Ausbildung

1978 - 1980: Besuch der kath. Grundschule „Am Weiher“  
1980 - 1982: Besuch der Grundschule “Strenge 5”  
1982 - 1992: Besuch des kath. Gymnasiums “Sankt-Ansgar-Schule”,  
1988-1989: Highschool-Aufenthalt und -abschluss in den USA (FL)  
1992: Abitur an der “Sankt-Ansgar-Schule”  
1989 - 1993 Ausbildung zum chemisch-technischen Assistenten  
(CTA)  
schulbegleitend, Gymnasium Altona u. Gewerbeschule 13

#### Grundwehrdienst

1993 - 1994: Sanitätssoldat beim Sanitätsbataillon 3/806, Hamburg

#### Studium

WS 1994 - WS 1999: Studium der Biochemie/Molekularbiologie, Universität HH  
24.10.1996: Vordiplom  
Februar-Oktober 1999: Diplomarbeit zum Thema: “Analyse der Funktion des Adaptermoleküls p62<sup>dok</sup> in T-Zellen mit Hilfe von verschiedenen p62<sup>dok</sup>-Mutanten”, in der Abteilung Immunologie, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg (Prof. Dr. B. Fleischer)  
16.11.1999: Hauptdiplom

<u>Stipendium</u>	SS 1997 - WS 1999 Stipendiat der Studienstiftung der katholischen Bischöfe Deutschlands, "Cusanuswerk", Bonn
<u>Lehrtätigkeit</u>	SS 2004 Lehrauftrag an der Fachhochschule Mannheim, Fachbereich Biotechnologie. Titel der Vorlesung: "Molecular Diagnosis", 2 SWS
<u>Promotion</u>	seit dem 15.11.2000 Anfertigung der Dissertation in der Abteilung Immungenetik des DKFZ Heidelberg (Prof. Dr. Peter H. Krammer)
<u>Auszeichnungen</u>	2003 Posterpreis des DKFZ