

**Eliminierung apoptotischer Zellen durch
professionelle Phagozyten:**

**Generierung, Freisetzung und Erkennung des monozytären
Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin und Bedeutung von
Annexin I als Brückenprotein in der phagozytotischen Synapse**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

**Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Universität Hohenheim**

und

**Universitätsklinikum Tübingen
Abteilung für Innere Medizin I
Sektion Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie**

vorgelegt von
Michaela Waibel

aus Schwäbisch Gmünd
2007

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Lutz Graeve
2. berichtende Person, 2. Prüfer:	Prof. Dr. Sebastian Wesselborg
3. Prüfer:	Prof. Dr. Tilman Grune
Eingereicht am:	14. Mai 2007
Mündliche Prüfung am:	26. September 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am 29. Juni 2007 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Danksagung

Prof. Dr. Sebastian Wesselborg danke ich für die Ermöglichung der Dissertation und seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Zeit.

Prof. Dr. Lutz Graeve danke ich für seine freundliche und spontane Bereitschaft, die Doktorarbeit vor der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim zu vertreten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Kirsten Lauber bedanken, die mir das Thema der Doktorarbeit überlassen hat und durch ihre vielen Ideen, ihr Engagement und die ständige Hilfsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die freundliche Überlassung verschiedener Zelllinien danke ich Prof. Dr. Reiner U. Jänicke, Prof. Dr. Alan Porter, Prof. Dr. Ralph Hass und Dr. Caius Radu.

Danke an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Wesselborg für die tolle Zeit im Labor und die fachliche und moralische Unterstützung: Alexandra, Antje, Björn, Christoph, Dorothee, Gerburg, Hildegard, Joachim, Karin, Kirsten, Marco, Merle, Sibylle und Szabolcs.

Besonders herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern, Anneliese und Franz Waibel, und bei meiner Schwester Sonja bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und die immer für mich da waren.

Anmerkungen

Folgende Teile der vorliegenden Arbeit sind im Rahmen von Gemeinschaftsprojekten innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wesselborg entstanden: Die in Abbildung 3.15 – 3.18 (Kapitel 3.4) dargestellten Ergebnisse sind dabei von Szabolcs Sörös während seiner Diplomarbeit erarbeitet worden (Titel: „Untersuchungen zur Bedeutung von Annexin I in der Apoptose und Eliminierung apoptotischer Zellen“). Kapitel 3.3 entstand in Zusammenarbeit mit Christoph Peter und Dr. Kirsten Lauber. Die Versuche zu Abbildung 3.10B (Kapitel 3.4) wurden von Karin Blume durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Apoptose	7
1.2	Signalwege der Apoptose	8
1.3	Caspasen	10
1.4	Regulatoren der Apoptose	11
1.5	Eliminierung apoptotischer Zellen	12
1.5.1	Anlockung von Phagozyten durch lösliche Attraktionssignale apoptotischer Zellen	12
1.5.2	Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten	14
1.5.3	Internalisierung apoptotischer Zellen und post-phagozytotische Reaktionen	16
1.6	Annexin I	18
1.7	Zielsetzung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Reagenzien	21
2.1.1	Herstellerverzeichnis	21
2.1.2	Antikörper	23
2.1.3	Plasmidkonstrukte	24
2.1.4	Gereinigte Proteine	25
2.1.5	siRNA-Oligonukleotide	26
2.2	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	27
2.2.2	Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	28
2.2.3	Transfektion von eukaryontischen Zellen	29
2.2.4	Apoptose-Induktion und Produktion von chemotaktisch aktiven Zellkulturüberständen	30
2.2.5	Nekrose-Induktion	32
2.2.6	Phagozytostest	32
2.2.7	PLA ₂ -Aktivitätstest	34
2.2.8	Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)	35
2.2.9	Zellbiologische Nachweismethoden des Zelltods	35
2.2.10	Transmigrationstest	37
2.3	Biochemische Methoden	38
2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	38
2.3.2	Herstellung von Zelllysaten	39
2.3.3	Aufreinigung von FLAG-Fusionsproteinen	39
2.3.4	<i>In vitro</i> -Spaltung von Proteinen mit Hilfe gereinigter Caspasen	40
2.3.5	Präparation von Membran- und Cytosolfractionen	41
2.3.6	Präzipitationen	42
2.3.7	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.3.8	Silberfärbung von Proteingelen	44
2.3.9	Westernblot	45
2.3.10	Anti-FLAG-ELISA	46
2.3.11	<i>In vitro</i> -Phospholipase A ₂ -Aktivitätstest	47
2.3.12	Nachweis von Lysophosphatidylcholin	48
2.3.13	Nachweis von Lipid-Hydroperoxiden	50
2.4	Molekularbiologische Methoden	51
2.4.1	RNA-Extraktion aus eukaryontischen Zellen	51
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	52
2.4.3	Reverse Transkription	52
2.4.4	<i>Real-Time</i> PCR	53
2.4.5	Plasmid-DNA Isolierung	56
2.4.6	Anlage einer Bakterien Glycerin-Dauerkultur	57

3	ERGEBNISSE	58
3.1	Prozessierung und Aktivierung der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂) während der Apoptose	58
3.1.1	iPLA ₂ wird während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert	58
3.1.2	Prozessierte iPLA ₂ hat eine höhere Aktivität als das Vollängen-Protein	60
3.2	Produktion und Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose	62
3.2.1	Nachweis von Lysophosphatidylcholin in den Überständen apoptotischer Zellen	62
3.2.2	Aktive iPLA ₂ ist essentiell für die Generierung des Attraktionssignals, alleine jedoch nicht hinreichend für dessen Freisetzung	62
3.2.3	Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung des Attraktionssignals in apoptotischen Zellen	66
3.2.4	Die Inhibierung von ABCA-Transportern hemmt die Freisetzung des Attraktionssignals	68
3.2.5	Für die Freisetzung des Attraktionssignals aus apoptotischen Zellen ist ABCA1 essentiell, nicht ABCA7	70
3.2.6	Überexpression von iPLA ₂ und Aktivierung des ABCA1-Transporters führt auch bei vitalen Zellen zur Freisetzung des Attraktionssignals	73
3.3	Die Migration monozytärer Zellen auf das Attraktionssignal LPC wird durch den G2A-Rezeptor vermittelt	74
3.3.1	Vergleich der monozytären Zelllinien THP-1 und U937	74
3.3.2	Für die Migration von THP-1 Zellen auf das Attraktionssignal LPC ist G2A verantwortlich, nicht GPR4	76
3.3.3	G2A-exprimierende U937 Zellen wandern auf apoptotische Überstände und gereinigtes Lysophosphatidylcholin	78
3.4	Rolle von Annexin I bei der Eliminierung apoptotischer Zellen	79
3.4.1	Annexin I hat keinen Einfluss auf die Freisetzung apoptotischer Attraktionssignale	80
3.4.2	Annexin I wird von spät-apoptotischen Jurkat Zellen externalisiert, unabhängig vom verwendeten Stimulus	82
3.4.3	Die Externalisierung ist keine generelle Eigenschaft von Proteinen der Annexin-Familie	84
3.4.4	Die Annexin-I-Externalisierung ist Zelltyp-abhängig und geht mit einer Spaltung von Annexin I einher	85
3.4.5	Externalisiertes Annexin I bindet Calcium-abhängig an die phosphatidylserinreiche Oberfläche apoptotischer Zellen	87
3.4.6	Der <i>knock down</i> von Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose spät-apoptotischer Jurkat-Zellen	89
3.4.7	Die Beschichtung apoptotischer THP-1 Zellen mit Annexin I stimuliert deren Phagozytose	91
4	DISKUSSION	93
4.1	Prozessierung und Aktivierung der iPLA₂ während der Apoptose	93
4.2	Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose	95
4.3	Die Migration von Monozyten auf das Attraktionssignal LPC wird durch den G2A-Rezeptor vermittelt	100
4.4	Rolle von Annexin I bei der Eliminierung apoptotischer Zellen	102
5	ZUSAMMENFASSUNG	109
6	LITERATUR	111
7	PUBLIKATIONEN	122
8	LEBENS LAUF	123

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäure(n)
α	anti
ABC	Adenosyl-5'-triphosphat Bindungskassette
Anx	Annexin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2 Antagonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
BBPC	Bis-BODIPY®FL C ₁₁ -PC
Bcl-2	<i>B Cell Lymphoma/Leukemia-2</i>
BEL	Bromenollacton
Bfl-1	<i>Bcl-2 Homologue Isolated from a Human Fetal Liver</i>
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
bidest.	bidestilliert
Bim	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
Blk	<i>Bik-Like Killer Protein</i>
Bok	<i>Bcl-2-Related Ovarian Killer</i>
Boo	<i>Bcl-2 Homologue of Ovary</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
β 2-GPI	β 2-Glykoprotein I
C	Cytosin
C1q	Komplementprotein 1q
C3b/bi	Komplementprotein 3b/bi
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
Casp	Caspase
Caspase	Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD95	APO-1, Fas
cDNA	Komplementäre DNA
CED	<i>Cell Death Protein</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHAPS	(3-([3-Cholamidopropyl]-dimethylammonium)-1-propansulfonat
CM-H ₂ DCFDA	5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'- Dichlorodihydrofluorescein Diacetat
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DD	Todesdomäne (<i>Death Domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>Death Effector Domain</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DcR	<i>Decoy Receptor</i>
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with low pI</i>
DISC	Todessignal-Komplex (<i>Death Inducing Signaling Complex</i>)
Diva	<i>Death Inducer Binding to Bcl-2 and Apaf-1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonukleinsäure-Hydrolase
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
Etopo	Etoposid
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-Associating Protein with Death Domain</i> (MORT1)
Fas	<i>Fibroblast Associated Antigen</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FI	Fluoreszenzkanal
FLICE	<i>FADD-Like Ice</i>
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
FPR	Formylpeptidrezeptor
FPRL	<i>FPR-like</i>
FU	<i>Fluorescence Unit</i>
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung [m/s^2]
Gas6	<i>growth arrest-specific 6</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure
His	Histidin
His-Tag	Hexahistidin-Fusionstag
Hrk	<i>Harakiri</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICE	<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomyacin
iPLA ₂	Calcium-unabhängige Phospholipase A ₂

JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LOOH	Lipid-Hydroperoxid(e)
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPR	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	Mili (10^{-3})
m	Meter
M	Molarität, molar
μ	Mikro (10^{-6})
MFG-E8	<i>milk-fat-globule-EGF-factor 8</i>
min	Minute(n)
Mito	Mitomycin C
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
n	nano
Nbk	<i>Natural Born Killer</i>
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
nt	Nukleotid(e)
ori	Replikationsursprung
oxLDL	Oxidiertes <i>low-density lipoprotein</i>
p50	Protein mit einer Molekularmasse von 50 kDa
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PHA	Phytohämagglutinin A
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolmyristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PSR	Phosphatidylserin-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription, Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SDF-1 α	<i>Stromal-Cell-derived Factor 1-alpha</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFM	Serumfreies Medium
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SM	<i>Sphingomyelin</i>
Smac	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase</i>
Stauro	Staurosporin
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglycol-p-isooctylphenoether
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Enzymeinheit
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
vol	Volumeneinheit
vt	Vektor
w/v	Gewicht / Volumen
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Das ursprünglich aus dem Griechischen stammende Wort „Apoptose“ bezeichnet sinngemäß das Herabfallen der Blätter im Herbst und wurde von Kerr et al. zum Anlass genommen, um das Selbstmordprogramm eukaryontischer Zellen zu beschreiben (Kerr et al., 1972). Die Apoptose spielt eine maßgebliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Erhaltung der Gewebshomöostase in adulten Organismen und bei der Eliminierung von Zellen, die z.B. durch Mutationen oder virale Infektionen geschädigt wurden. Zudem trägt die Apoptose zur Regulation des Immunsystems bei, z.B. bei der klonalen Deletion autoreaktiver T-Zellen. Dabei ist die Apoptose eine physiologische und „stille“ Form des Zelltods, bei der einzelne Zellen, Zellverbände oder Organe (z.B. bei der Metamorphose von Amphibien) ohne eine Belastung des Gesamtorganismus eliminiert werden.

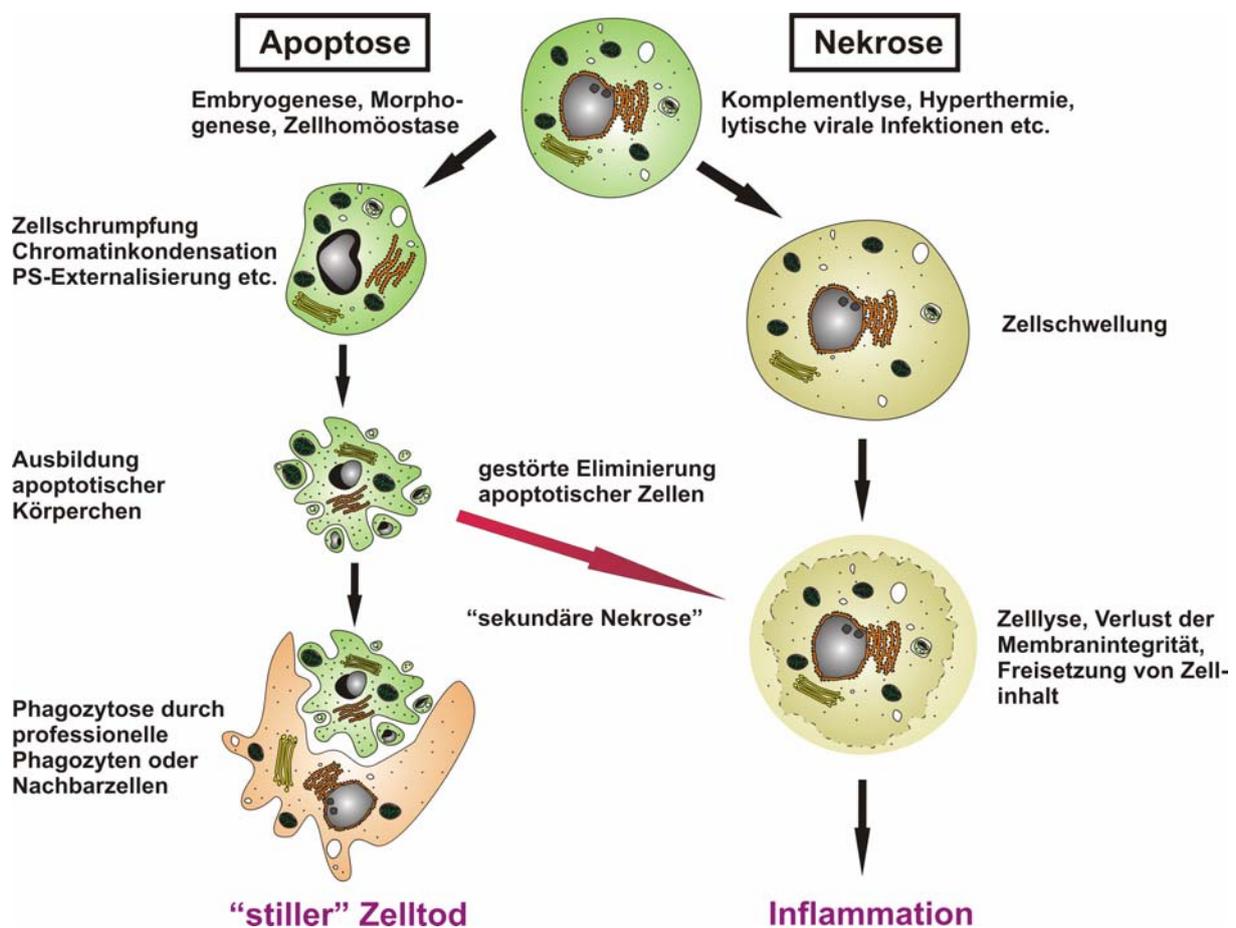


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose und der Nekrose.

Charakteristisch für den apoptotischen Zelltod ist das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Chromatins und die anschließende Fragmentierung des Zellkerns. Es kommt zur Externalisierung von Phosphatidylserin und die Zelle zerfällt schließlich in kleine, membranumschlossene Vesikel, die apoptotischen Körperchen. Diese können von professionellen Phagozyten oder Nachbarzellen internalisiert und abgebaut werden. Während der Nekrose schwillt die Zelle an, es kommt zur Ruptur der Plasmamembran und zellulärer Inhalt kann freigesetzt werden. Ist die Eliminierung apoptotischer Zellen gestört, verlieren diese mit der Zeit ihre Membranintegrität und werden sekundär nekrotisch. Dadurch können nicht-eliminierte apoptotische Zellen, ebenso wie primär nekrotische Zellen, inflammatorische Reaktionen auslösen.

Verschiedene morphologische und biochemische Veränderungen charakterisieren die Apoptose: Die Zellen schrumpfen und lösen sich von den Nachbarzellen ab. Es kommt zur Kondensation des Chromatins, und die DNA wird durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten, wodurch DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 200 Basenpaaren oder ganzzahligen Vielfachen davon entstehen (Nagata, 2000). Der Verlust der Membranasymmetrie führt unter anderem dazu, dass Phosphatidylserin, ein in vitalen Zellen ausschließlich auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiertes Phospholipid, während der Apoptose zunehmend auf der Zelloberfläche erscheint (Fadok et al., 1992). Intrazellulär kommt es zur Depolarisierung des Mitochondrienmembranpotentials und zu einem cytosolischen pH-Wert-Abfall (Ly et al., 2003; Matsuyama et al., 2000; Nilsson et al., 2006). An der Zellmembran werden Ausstülpungen gebildet (Zeiose, *Blebbing*) und es werden immer mehr membranumschlossene Partikel abgeschnürt, die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten. Dabei bleibt der Zellinhalt während des gesamten Prozesses von einer intakten Membran umschlossen und wird, im Gegensatz zur Nekrose, nicht in umliegendes Gewebe freigesetzt (Fink und Cookson, 2005; Leist und Jaattela, 2001; Strasser et al., 2000). Apoptotische Zellen und abgeschnürte Zellpartikel, auch apoptotische Körperchen genannt, werden normalerweise von benachbarten Zellen oder von professionellen Phagozyten erkannt, internalisiert und abgebaut (Savill und Fadok, 2000). Ist diese Eliminierung gestört, werden die apoptotischen Zellen sekundär nekrotisch (siehe Abbildung 1.1). Durch den Verlust der Membranintegrität kann Zellinhalt austreten und die für die Nekrose bekannten inflammatorischen Reaktionen im Gewebe hervorrufen (Farber, 1994; Wu et al., 2001).

Zunächst lange Zeit nur in Metazoen beobachtet, zeigten Arbeiten von Madeo et al., dass auch einzellige Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* durch einen Apoptose-ähnlichen Zelltod sterben können (Madeo et al., 1997; Madeo et al., 2002).

1.2 Signalwege der Apoptose

Die Apoptose ist ebenso wie die Zellproliferation und Zelldifferenzierung einer inter- und intrazellulären Kommunikation unterworfen und kann über verschiedene Mechanismen induziert und reguliert werden. Im Folgenden werden die beiden Hauptsignalwege der Apoptose beschrieben: der extrinsische Todesrezeptor-Signalweg und der intrinsische, mitochondriale Signalweg (siehe Abbildung 1.2).

Der extrinsische Signalweg wird ausgelöst durch die extrazelluläre Aktivierung der so genannten Todesrezeptoren. Diese gehören zur TNF-Rezeptor Superfamilie und sind charakterisiert durch mehrere extrazelluläre, Cystein-reiche Domänen, eine Transmembranregion und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD, *death domain*), die aus ca. 80 Aminosäuren besteht und keine katalytischen Eigenschaften besitzt. Als erster Todesrezeptor wurde CD95 (Apo-1/Fas) beschrieben (Itoh et al., 1991); inzwischen sind insgesamt 6 Mitglieder der Todesrezeptorfamilie identifiziert worden (TNF-R1, CD95, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6) (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Die zugehörigen Liganden sind homotrimere Proteine der TNF-Familie (CD95L, TNF α , TRAIL, TWEAK und RANKL), die ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung aktivieren (Banner et al., 1993; Beutler und van Huffel, 1994; Dhein et al., 1992; Eck und Sprang, 1989; Jones et al., 1992; Wiley et al., 1995). Die Todesliganden werden zumeist als Transmembranproteine synthetisiert, können jedoch

durch alternatives Spleißen oder spezifische Metalloproteasen auch in löslicher Form vorkommen (Suda et al., 1993). Bei dem bis jetzt am besten untersuchten CD95-Rezeptor/Ligand-System führt die Ligandenbindung zur Trimerisierung des Rezeptors und leitet damit die Bildung des Todessignalkomplexes (DISC, *death inducing signaling complex*) ein. Das Adapterprotein FADD (*Fas-associating protein with death domain*) kann dabei durch die homophile Interaktion der Todesdomänen von CD95 und FADD rekrutiert werden. FADD besitzt eine weitere Adapterdomäne, die so genannte Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*), über die Pro-Caspase-8, die ebenfalls eine Todeseffektordomäne besitzt, homophil gebunden werden kann (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997; Muzio et al., 1996). Durch die lokale Aggregation mehrerer Caspase-8-Zymogene kommt es zu deren autokatalytischer Aktivierung (Martin et al., 1998; Muzio et al., 1998); man spricht hierbei vom Modell der „induzierten Proximität“ (Salvesen und Dixit, 1999). Nach ihrer Aktivierung und Freisetzung aus dem Todesrezeptorkomplex spaltet Caspase-8 als so genannte Initiator-Caspase durch limitierte Proteolyse v.a. die sogenannten Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, die durch Prozessierung von relevanten Apoptosesubstraten letztlich den programmierten Tod der Zellen auslösen.

Andere Apoptose-Stimuli, wie z.B. Zytostatika, oder physikalischer Stress wie UV- oder Gamma-Strahlung, wirken Todesrezeptor-unabhängig und stimulieren den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg der Apoptose. Das ausschlaggebende Ereignis hierbei ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. In vitalen Zellen ist die Mitochondrienaußenmembran undurchlässig für Cytochrom c, dessen Funktion in der Elektronenübertragung zwischen Komplex III und Komplex IV der Atmungskette besteht. Durch den Verlust der Mitochondrienmembranintegrität und durch Beteiligung von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (siehe unten) kann jedoch während der Apoptose Cytochrom c ins Cytosol gelangen und dort als *second-messenger* fungieren. Es induziert die an die Hydrolyse von ATP oder dATP gekoppelte Oligomerisierung des Adapterproteins Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) (Zou et al., 1997). Durch die homophile Interaktion der CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*) von Apaf-1 mit der CARD-Region von Pro-Caspase-9 entsteht ein hochmolekularer Komplex von ca. 700 kDa, das so genannte Apoptosom (Acehan et al., 2002; Adrain et al., 1999; Cain et al., 2002; Cain et al., 2000; Li et al., 1997; Ott et al., 2002; Saleh et al., 1999; Shi, 2001; Zou et al., 1999). Das Apoptosom entspricht in seiner Funktion dem Todesrezeptorkomplex, und das Caspase-9-Zymogen wird, ähnlich wie Pro-Caspase-8 am DISC, nach dem Prinzip der induzierten Proximität autoproteolytisch prozessiert und damit aktiviert (Rodriguez und Lazebnik, 1999). Als zweite zentrale Initiator-Caspase löst Caspase-9 über die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-7 ebenfalls die Caspase-Kaskade aus und leitet damit die Apoptose ein.

Die beiden beschriebenen Signalwege können unabhängig voneinander ablaufen, sind jedoch auch miteinander verbunden. So kann aktive Caspase-8 das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid (siehe Abschnitt 1.4) proteolytisch aktivieren, das in seiner trunkierten Form ans Mitochondrium transloziert und dort die Freisetzung von Cytochrom c stimuliert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Somit kann der mitochondriale Apoptoseweg zusätzlich als Verstärkungsmechanismus des Todesrezeptorwegs wirken.

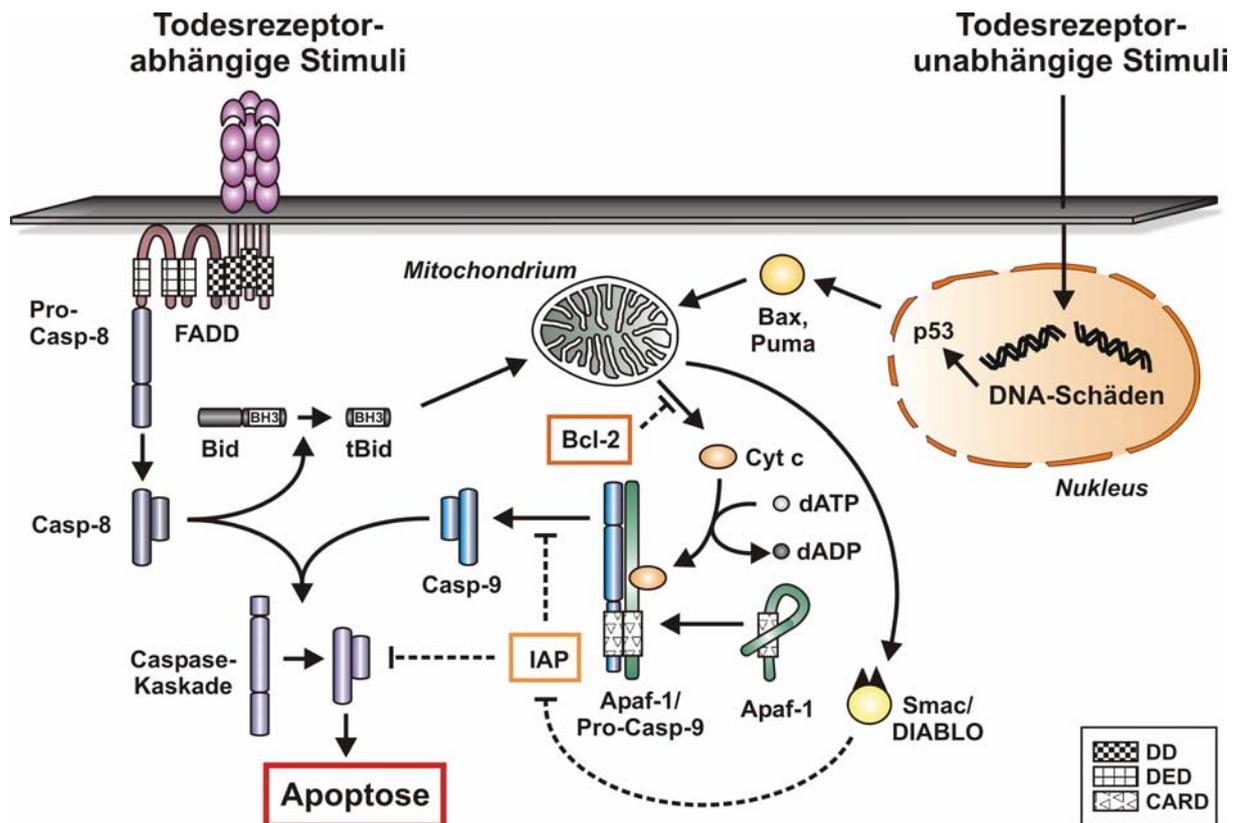


Abbildung 1.2: Die Hauptsignalwege der Apoptose

Der **extrinsische Todesrezeptor-Signalweg** verläuft über den Todesrezeptor, der nach Bindung entsprechender Liganden trimerisieren und einen Signalkomplex (DISC, *death inducing signaling complex*) aus Rezeptor, FADD (*Fas-associating protein with death domain*) und Pro-Caspase-8 ausbildet. Die Bindung zwischen den einzelnen Proteinen im Komplex erfolgt über Todesdomänen (DD, *death domain*) bzw. Todeseffektordomänen (DED, *death effector domain*). Die autoproteolytische Aktivierung von Pro-Caspase-8 löst die Caspase-Kaskade aus, die letztlich zur Apoptose führt.

Der **intrinsische, mitochondriale Signalweg** beginnt mit der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Ähnlich wie beim DISC kommt es auch bei diesem Signalweg zur Ausbildung eines hochmolekularen Komplexes, dem Apoptosom. Dieses wird unter (d)ATP-Verbrauch aus Cytochrom c, Apaf-1 und Pro-Caspase-9 gebildet, wobei die Proteine über die Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD, *caspase recruitment domain*) miteinander interagieren. Dadurch wird Pro-Caspase-9 autoproteolytisch aktiviert und die Caspase-Kaskade eingeleitet. Wichtige Regulatoren des mitochondrialen Signalwegs sind Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-2, Bax, Puma und Noxa. Diese sind in der Lage, am Mitochondrium die Cytochrom-c-Freisetzung zu hemmen bzw. zu induzieren. Der mitochondriale Signalweg kann unter anderem durch DNA-Schäden induziert werden, z.B. durch UV- oder Gamma-Strahlung. Die beiden Signalwege sind über die Aktivierung des pro-apoptischen Bcl-2-Proteins Bid verknüpft, das von Caspase-8 gespalten werden kann und in seiner trinktierten Form in der Lage ist, die Cytochrom-c-Freisetzung zu vermitteln.

Der Verlauf der Apoptose kann unter anderem durch Proteine der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis proteins*) reguliert werden, die direkt mit aktiven Caspasen interagieren und diese hemmen können. Die IAP-vermittelte Caspasen-Inhibition kann durch das Protein Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI*) aufgehoben werden, das, ähnlich wie Cytochrom c, aus Mitochondrien freigesetzt werden kann. Abbildung nach Lauber (Dissertation, 2003).

1.3 Caspasen

Entscheidend für den Verlauf der Apoptose, der letztendlich in der Desintegration und Eliminierung von Zellen durch Phagozyten mündet, ist die proteolytische Prozessierung von Proteinen durch Caspasen (Budihardjo et al., 1999). Caspasen sind Cysteinproteasen, die Proteine spezifisch hinter Aspartatresten spalten; dieser Eigenschaft verdanken sie auch ihren Namen (*CysteinyI ASPartat-specific proteASE*). Sie werden zunächst als 30 - 55 kDa große Zymogene mit lediglich sehr geringer enzymatischer Aktivität synthetisiert. Ihre proteolytische Aktivierung erfolgt meist durch andere Caspasen, im Falle der Initiator-Caspasen durch deren autokatalytische Prozessierung (siehe oben). Dabei werden die Zymogene in eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa)

gespalten und die N-terminale Prodomäne entfernt. In ihrer aktiven Form liegen Caspasen in der Regel als Heterotetramere vor, bestehend aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Die bislang bekannten Mitglieder der humanen Caspase-Familie lassen sich phylogenetisch in zwei Unterfamilien einteilen, die entweder wichtig für die Zytokinreifung sind (Caspase-1, 4, 5 und 11) oder die bei der Apoptose von Bedeutung sind. Innerhalb der Apoptose-Caspasen kann zwischen den Initiator-Caspasen (Caspase-2, 8, 9 und 10) und den Effektor-Caspasen (Caspase-3, 6 und 7) unterschieden werden. Die Initiator-Caspasen haben aufgrund ihrer N-terminal gelegenen Adapter-Regionen (CARD- oder DED-Domäne, siehe Abschnitt 1.2) sehr lange Prodomänen, die bei den Effektor-Caspasen oftmals nur aus wenigen Aminosäuren bestehen. Die Aktivierung der Initiator-Caspasen geht der Aktivierung der Effektor-Caspasen immer voraus. Vergleichbar mit der Blutgerinnung oder dem Komplementsystem entsteht so bei der Einleitung der Apoptose durch proteolytische Auto- und Transaktivierungen eine irreversible Caspase-Kaskade (Fischer et al., 2003; Slee et al., 1999).

Es sind inzwischen viele Proteine bekannt, die durch Caspasen prozessiert und somit irreversibel in ihrer Funktion beeinflusst werden (Fischer et al., 2003; Stroh und Schulze-Osthoff, 1998). Bei der Caspase-vermittelten Prozessierung handelt es sich um eine gezielte, limitierte Proteolyse, durch die die Zielproteine in der Regel inaktiviert werden. Dazu gehören z.B. Zytoskelett- und Strukturproteine, Zelladhäsionsproteine oder Proteine, die am Zellzyklus, der DNA-Replikation oder der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die Spaltung von Zielproteinen kann in einigen Fällen jedoch auch zu deren Aktivierung führen. Dies ist der Fall bei der Spaltung von Caspasen (siehe oben), bei Zytokin-Präkursoren und vielen Proteinkinasen. In der Summe führt die Spaltung der verschiedenen Proteine durch Caspasen zum Zellzyklusarrest, zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten, zur Markierung von apoptotischen Zellen für die Phagozytose und zur Desintegration der Zelle.

1.4 Regulatoren der Apoptose

Neben der Expression der an den beschriebenen Signalwegen beteiligten Proteine können verschiedene Regulationsmechanismen Einfluss auf den Verlauf der Apoptose nehmen. Auf Rezeptorebene geschieht diese Regulation z.B. durch die Expression der TRAIL-Rezeptoren DcR1 und DcR2 (DcR = *Decoy Receptor*), die zwar TRAIL binden können, jedoch aufgrund einer fehlenden funktionellen Todesdomäne das Signal nicht weiterleiten und somit zu einer Resistenz gegenüber TRAIL führen (Degli-Esposti et al., 1997a; Degli-Esposti et al., 1997b; MacFarlane et al., 1997; Marsters et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit, die Bildung eines funktionellen DISC zu verhindern, sind die so genannten FLIP-Moleküle (*FLICE inhibitory protein*; FLICE = ursprünglicher Name für Caspase-8). FLIPs haben Homologie zur Todeseffektordomäne von Caspasen und können durch Bindung an FADD die Rekrutierung von Caspase-8 und damit deren Aktivierung verhindern (Scaffidi et al., 1999). So ist ein möglicher Resistenzmechanismus von Tumorzellen gegenüber der CD95-Ligand/Rezeptor-vermittelten Apoptose die Expression von FLIPs (Troeger et al., 2007).

Eine zentrale Bedeutung als Regulatoren der Apoptose haben die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Ihnen ist der Besitz verschiedener Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-4) gemeinsam, über die Homo- und Heterodimere gebildet werden können. Zur Bcl-2-Familie gehören die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva und die pro-apoptotischen Mitglieder Bax, Bok/Mtd, Bcl-x_s, Bak,

Bad, Bik/Nbk, Bid, Hrk/DP5, Blk und Bim (Adams und Cory, 2001; Reed et al., 1998). Außer A1/Bfl-1, Bid und Bad besitzen alle Mitglieder eine C-terminale Transmembrandomäne, über die sie in der Kernmembran, dem endoplasmatischen Reticulum oder der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind. Alle Bcl-2-Familienmitglieder regulieren die Apoptose über die mitochondriale Cytochrom-c-Freisetzung. Pro-apoptotische Mediatoren wie Bax, Puma und Noxa können durch DNA-Schädigung p53-abhängig induziert werden und nach Translokation ans Mitochondrium die Cytochrom-c-Freisetzung bewirken (Eskes et al., 1998; Jia et al., 2001; Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000). Auch Bid transloziert nach seiner Caspase-8-vermittelten Spaltung ans Mitochondrium und fördert dort die Cytochrom-c-Freisetzung (siehe oben). Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie wirken im Gegensatz dazu dem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials und der Cytochrom-c-Freisetzung entgegen (Cosulich et al., 1999; Miyashita und Reed, 1993; Strasser et al., 1995; Yang et al., 1997).

Auch auf Ebene der Caspasen kann der Verlauf der Apoptose reguliert werden. So sind die Proteine der IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis proteins*) in der Lage, direkt mit Caspasen zu interagieren und deren Aktivität reversibel zu inhibieren (Deveraux und Reed, 1999). Bis heute sind in Säugern acht verschiedene IAPs identifiziert worden, die alle anti-apoptotisch wirken (Ambrosini et al., 1997; Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996). IAPs verhindern die Substratbindung von Caspasen durch Interaktion mit deren aktivem Zentrum; innerhalb der Caspase-Familie inhibieren sie ausschließlich die Caspasen-9, -3 und -7 (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001). Die IAP-vermittelte Inhibition der Caspasen kann durch das Protein Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI*) aufgehoben werden (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Dieses kann, ähnlich wie Cytochrom c, während der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt werden und die Caspasen aus ihrer Bindung mit IAPs verdrängen (Du et al., 2000; Ekert et al., 2001; Shi, 2001; Srinivasula et al., 2000; Srinivasula et al., 2001; Wu et al., 2000a).

1.5 Eliminierung apoptotischer Zellen

1.5.1 Anlockung von Phagozyten durch lösliche Attraktionssignale apoptotischer Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, werden apoptotische Zellen normalerweise durch benachbarte Zellen oder Phagozyten eliminiert, bevor sie ihre Membranintegrität verlieren und potentiell inflammatorischer Zellinhalt austreten kann. Im Gegensatz zum Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*, in dem sterbende Zellen durch Nachbarzellen phagozytiert werden, gibt es in höheren Organismen spezialisierte Phagozyten, die diese Aufgabe wahrnehmen. Da diese jedoch zunächst oft nicht in direkter Nähe der apoptotischen Beute zu finden sind, setzen sterbende Zellen lösliche Attraktionssignale frei, um Phagozyten anzulocken. Das bis jetzt am besten charakterisierte so genannte „find-me“-Signal ist Lysophosphatidylcholin (LPC), das die Migration monozytärer Zellen induziert. LPC wird von den sterbenden Zellen Caspase-3-abhängig durch die iPLA₂-(Calcium-unabhängige Phospholipase A₂)-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylcholin generiert und freigesetzt (siehe Abbildung 1.3). Dabei wird die 86-kDa-Volllängenform der iPLA₂ während der Apoptose Caspase-3-abhängig in ein 26 kDa großes Fragment prozessiert, dem sowohl die N-

terminalen Ankyrin-Domänen als auch der C-Terminus fehlen (Lauber et al., 2003). Larsson et al. zeigten, dass die Ankyrin-Motive inhibitorisch auf die $iPLA_2$ -Aktivität wirken können (Larsson et al., 1998) und Atsumi et al. konnten nachweisen, dass die Caspase-vermittelte Prozessierung von $iPLA_2$ zu einer erhöhten Arachidonsäure-Produktion führt (Atsumi et al., 2000). Die Beobachtung, dass die Überexpression der trunkierten 26-kDa- $iPLA_2$ in vitalen Zellen nicht zur Freisetzung von LPC führt, deutet darauf hin, dass wahrscheinlich weitere apoptotische Ereignisse an der Generierung und / oder der Freisetzung des Attraktionssignals LPC beteiligt sind (Lauber et al., 2003).

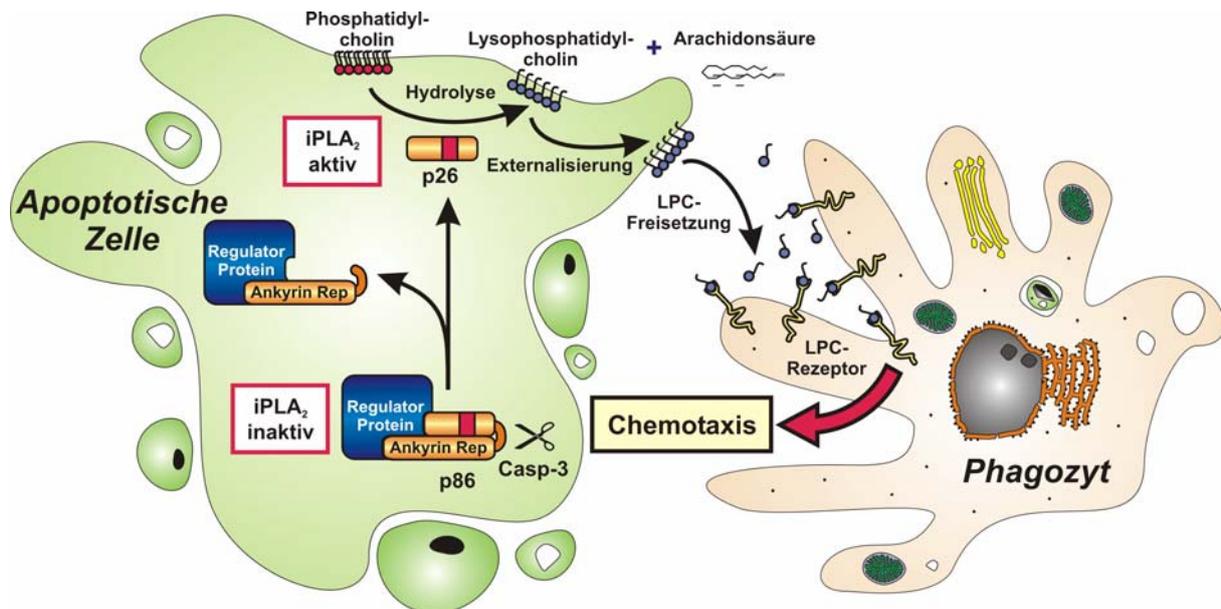


Abbildung 1.3: Modell der Caspase-3- und $iPLA_2$ -vermittelten Anlockung von Phagozyten.

Während der Apoptose wird die Calcium-unabhängige Phospholipase A_2 ($iPLA_2$) Caspase-3-abhängig prozessiert. Dabei werden möglicherweise auch mit $iPLA_2$ assoziierte Inhibitoren abgespalten und das Enzym dadurch aktiviert. Aktive $iPLA_2$ hydrolysiert an der Plasmamembran Phosphatidylcholin, wodurch Lysophosphatidylcholin (LPC) und eine freie Fettsäure, meist Arachidonsäure, entstehen. Das Attraktionssignal LPC wird daraufhin von den apoptotischen Zellen freigesetzt und kann über LPC-Rezeptoren auf den Phagozyten deren Migration hin zur apoptotischen Beute stimulieren. Abbildung nach Lauber et al. (Lauber et al., 2004).

Auch über die Rezeptoren, die für die LPC-vermittelte Migration monozytärer Zellen verantwortlich sind, ist noch wenig bekannt. 2001 wurden die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren G2A und GPR4 als LPC-Rezeptoren identifiziert (Kabarowski et al., 2001; Zhu et al., 2001), und weitere Untersuchungen zeigten eine LPC-vermittelte Migration von T-Zellen und Makrophagen durch G2A (Radu et al., 2004; Yang et al., 2005). Jedoch musste die Veröffentlichung von Kabarowski et al. aufgrund nicht reproduzierbarer Bindungsdaten zurückgezogen werden (Witte et al., 2005) und es ist weiterhin unklar, ob und wie LPC mit dem G2A-Rezeptor interagiert. Auch die Arbeit von Zhu et al. wurde zurückgezogen (2005) und eine Beteiligung von GPR4 an der LPC-vermittelten Migration seitdem nicht mehr gezeigt.

Neben LPC konnten weitere chemotaktisch aktive Signale apoptotischer Zellen identifiziert werden, die zur Anlockung von Monozyten und Makrophagen führen. So wurde z.B. für Thrombospondin-1, die humane Aminoacyl-tRNA-Synthetase und das S19 ribosomale Protein-Dimer eine Rolle bei der Rekrutierung von Phagozyten nachgewiesen (Horino et al., 1998; Moodley et al., 2003; Wakasugi und Schimmel, 1999). Ob diese Proteine unabhängig voneinander oder möglicherweise auch in

Kooperation mit dem Phospholipid-Attraktionssignal LPC wirken können, ist bislang noch nicht untersucht.

1.5.2 Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten

Nachdem, wie oben beschrieben, in höheren Organismen die Freisetzung löslicher „find-me“-Signale zur Anlockung von Phagozyten führt, ist es für den weiteren Verlauf der Eliminierung entscheidend, dass die apoptotische Zelle durch spezialisierte Makrophagen oder durch Nachbarzellen als solche erkannt und anschließend internalisiert wird. Die Erkennung der apoptotischen Zelle durch Phagozyten wird durch so genannte „eat-me“-Signale auf der Oberfläche der sterbenden Zelle vermittelt. Diese Signale werden entweder während der Apoptose externalisiert, wie z.B. Phosphatidylserin, oder sie entstehen durch Oxidation oder andere Modifikationen von Oberflächenmolekülen. Das bis heute am besten charakterisierte „eat-me“-Signal ist Phosphatidylserin (PS), dessen Translokation von der Innenseite der Plasmamembran auf die Zelloberfläche ein wichtiger Apoptose-Marker ist (Fadok et al., 1992). Für die PS-Externalisierung ist sowohl die Inaktivierung der Aminophospholipid-Translokase, die PS in vitalen Zellen von außen nach innen transportiert, als auch die Aktivierung einer Lipid-Scramblase wichtig (Williamson und Schlegel, 2002). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Beteiligung des *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporters ABCA1 gezeigt (Hamon et al., 2000), jedoch ist der genaue Externalisierungsmechanismus noch unklar. Neben externalisiertem PS gibt es weitere „eat-me“-Signale wie z.B. Thrombospondin-1-, C1q- und C3b/bi-bindende Stellen und Oberflächenstrukturen, die oxidiertem LDL (oxLDL) ähnlich sind (siehe Abbildung 1.4).

Die Erkennung der „eat-me“-Signale erfolgt über spezifische Rezeptoren auf den Phagozyten, wobei die Bindung entweder direkt an das Oberflächenmolekül oder indirekt über Brückenmoleküle erfolgen kann. Die Bindung verschiedener Rezeptoren an externalisiertes PS ist dabei eher indirekter Natur und kann durch mehrere Proteine vermittelt werden. Erst kürzlich konnte dabei Annexin I als ein Brückenmolekül identifiziert werden, dass die Bindung von PS an den PS-Rezeptor ermöglicht und damit eine wichtige Rolle bei der Phagozytose spielt (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004). Die Identität des PS-Rezeptors ist inzwischen jedoch sehr umstritten und völlig unklar seitdem gezeigt werden konnte, dass das von Fadok et al. identifizierte und klonierte vermeintliche PS-Rezeptor-Gen (Fadok et al., 2000) nicht für einen Membranrezeptor, sondern eher für ein nukleäres Protein kodiert (Cikala et al., 2004; Cui et al., 2004). Da Arur et al. in ihrer Arbeit zur Funktion von Annexin I Expressionskonstrukte für den PS-Rezeptor verwendet haben, die ausgehend von der Klonierung durch Fadok et al. hergestellt wurden ist offen, an welchen phagozytären Rezeptor das Brückenmolekül Annexin I tatsächlich bindet. Weitere Brückenproteine wie MFG-E8 (*milk-fat-globule-EGF-factor 8*), Gas6 (*growth-arrest-specific 6*) und β 2-GPI (*β 2-glycoprotein-1*) können ebenfalls an PS binden und dadurch die Interaktion mit den zugehörigen phagozytären Rezeptoren Vitronectin-Rezeptor, der Rezeptor-Tyrosinkinase Mer und dem β 2-GPI-Rezeptor vermitteln (Balasubramanian et al., 1997; Borisenko et al., 2004; Hanayama et al., 2002; Ishimoto et al., 2000; Rubartelli et al., 1997; Scott et al., 2001). Auch die Erkennung der Thrombospondin-1-, C1q- und C3b/bi-bindende Stellen durch die Rezeptoren CD36/Vitronectin-Rezeptor und die Komplement-Rezeptoren CR3 und CR4 erfolgt indirekt über die Bindung von Thrombospondin-1 und die Komplementfaktoren C1q und C3b/bi

(Mevorach et al., 1998; Savill et al., 1992; Takizawa et al., 1996). Für die Bindung an Stellen, die oxidiertem LDL ähnlich sind, sind so genannte *Scavenger-Rezeptoren* wie SR-A (*class A macrophage scavenger receptor*), LOX-1 (*lectin-like oxLDL-receptor 1*), CD68 oder CD36 verantwortlich (Erdoşova et al., 2002; Oka et al., 1998; Platt et al., 1996; Ren et al., 1995).

Eine interessante Veröffentlichung von Kim et al. zeigte, dass das Attraktionssignal Lysophosphatidylcholin auch als membranständiges „eat-me“-Signal vorkommt und über die Bindung von IgM-Antikörpern zur Rekrutierung der Komplementfaktoren C1q und C3b/bi führen kann (Kim et al., 2002). Zudem ist LPC bereits seit langem als Hauptbestandteil von oxidierten LDL-Partikeln bekannt (Quinn et al., 1987; Quinn et al., 1988). Somit spielt LPC neben seiner Funktion als löslichem „find-me“-Signal auch eine Rolle als „eat-me“-Signal, und es wäre vorstellbar, dass die oben erwähnten C1q- und C3b/bi-bindenden Stellen sowie die oxLDL-ähnlichen Oberflächenstrukturen aus LPC bestehen könnten oder LPC zumindest Bestandteil dieser „eat-me“-Signale sein könnte (Lauber et al., 2004).

Über diese Vielzahl an membranständigen „eat-me“-Signalen und Brückenmolekülen sowie die verschiedenen phagozytären Rezeptoren kommt es zur Ausbildung der so genannten phagozytotischen Synapse (siehe Abbildung 1.4). Dabei besteht eine gewisse Redundanz innerhalb dieses komplexen Systems, und es müssen nicht unbedingt alle Signale vorhanden sein, um eine effiziente Eliminierung apoptotischer Zellen zu gewährleisten (Hoffmann et al., 2001; Somersan und Bhardwaj, 2001). In jedem Fall initiiert dieser enge Kontakt zwischen Zielzelle und Phagozyten die anschließende Internalisierung und den Abbau der sterbenden Zelle.

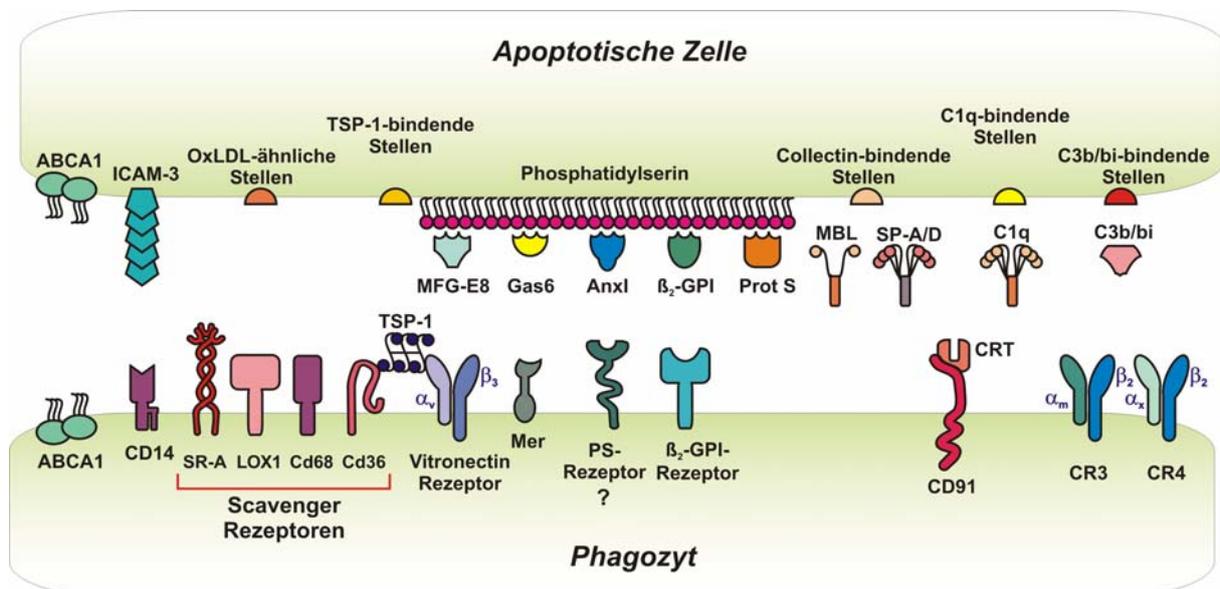


Abbildung 1.4: Modell der phagozytotischen Synapse.

Inzwischen ist eine Reihe von „eat-me“-Signalen, Brückenmolekülen und Rezeptoren identifiziert worden, die im Zusammenspiel die Erkennung und die Bindung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ermöglichen. Anschließend kommt es zur Internalisierung und zum Abbau der apoptotischen Zelle durch den Phagozyten.

ABCA1 (ABC-Transporter A1), Anx1 (Annexin 1), β_2 -GPI (β_2 -Glycoprotein 1), C1q (Komplementprotein 1q), C3b/bi (Komplementprotein 3b/bi), CD14 (Lipopolysaccharid-Rezeptor), CD91 (Calreticulin / Hitzeschockprotein-Rezeptor), CR3 (Komplement-Rezeptor 3), CR4 (Komplement-Rezeptor 4), CRT (Calreticulin / C1q-bindendes Protein), Gas6 (Wachstumsarrest-Faktor 6), ICAM-3 (Zelladhäsionsprotein), LOX1 (Lectin-ähnlicher OxLDL-Partikel-Rezeptor 1), MBL (Mannose bindendes Lectin), MER (Rezeptor-Tyrosin-Kinase), MFG-E8 (Milchfettglobulin-EGF-Faktor 8), OxLDL (oxidiertes „low-density“ Lipoprotein), Prot S (Protein S), PS (Phosphatidylserin), SP-A/D (Kollektin-A/D), SR-A (*Scavenger-Rezeptor A*), TSP-1 (Thrombospondin-1). Abbildung modifiziert nach Lauber et al. (Lauber et al., 2004).

1.5.3 Internalisierung apoptotischer Zellen und post-phagozytotische Reaktionen

Über die Mechanismen, die nach der Erkennung der apoptotischen Zelle zur Internalisierung und zum Abbau durch den Phagozyten führen, ist bislang wenig bekannt. Vor allem durch Studien von Hengartner und Horvitz im Modellorganismus *C. elegans* konnte jedoch ein erster Einblick gewonnen werden. In diesen Organismen spielen sieben Gene eine essentielle Rolle für die Phagozytose durch Nachbarzellen, wobei jede Gendeletion die Hemmung einer effizienten Eliminierung apoptotischer Zellen bewirkt (Gumienny und Hengartner, 2001). Die Genprodukte sind dabei in zwei partiell redundanten Signalkassetten arrangiert:

1) Der CED-2 - CED-5 - CED-12-Signalweg mit den Säugerhomologen Crkl / DOCK180 / ELMO, der zur Aktivierung von CED-10 (Rac1) führt (Reddien und Horvitz, 2004). Dadurch kommt es zur Aktin-Zytoskelett-Reorganisation, durch welche das Umfließen der Zielzelle initiiert wird.

2) Der CED-1 - CED-6 - CED-7-Signalweg. CED-1 ist homolog zum *Scavenger*-Rezeptor LPR/SREC von Säugern (Su et al., 2002; Zhou et al., 2001) und wahrscheinlich für die Erkennung der apoptotischen Zelle wichtig. Die Signalweiterleitung erfolgt dabei über CED-6, ein Adapterprotein mit Homologie zum Säugerprotein GULP (Liu und Hengartner, 1998; Su et al., 2002). CED-7 ist verwandt mit dem ABCA1-Transporter (Wu und Horvitz, 1998) und scheint wichtig für die Membrandynamik zu sein (Hamon et al., 2002). Eine aktuelle Veröffentlichung zeigt jedoch, dass eher ABCA7 das CED-7-homologe Säugerprotein sein könnte und möglicherweise durch die Formierung spezieller Membranmikrodomänen die Signalweiterleitung des LPR-Rezeptors ermöglicht (Jehle et al., 2006). Auch dieser Signalweg führt letztendlich zur Aktivierung von CED-10 (Rac1) und damit zur Zytoskelett-Reorganisation (Kinchen et al., 2005).

Welche molekularen Ereignisse letztendlich die vollständige Internalisierung und den anschließenden Abbau der apoptotischen Zelle steuern, ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Die effiziente Eliminierung apoptotischer Zellen zielt insgesamt darauf ab, sterbende Zellen zu beseitigen ohne dabei inflammatorische Prozesse auszulösen und den Organismus damit zu belasten. Dies wird durch eine Vielzahl an Veröffentlichungen belegt, die zeigen, dass die Eliminierung apoptotischer Zellen zu einer aktiven Unterdrückung von inflammatorischen Prozessen und Immunreaktionen führt. Dabei kommt es z.B. zur transkriptionellen Hemmung pro-inflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-12 (Kim et al., 2004) oder zur Stimulierung der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 oder TGF- β (*transforming growth factor β*) (Byrne und Reen, 2002; Fadok et al., 1998; Huynh et al., 2002; Voll et al., 1997).

Insgesamt kann die Eliminierung apoptotischer Zellen als dreistufiger Prozess gesehen werden, der über die Anlockung von Phagozyten durch lösliche „find-me“-Signale zur Erkennung und Internalisierung mit Hilfe verschiedener „eat-me“-Signale und letztendlich zur Degradation der apoptotischen Zelle und zur aktiven Unterdrückung entzündlicher Reaktionen führt (siehe Abbildung 1.5).

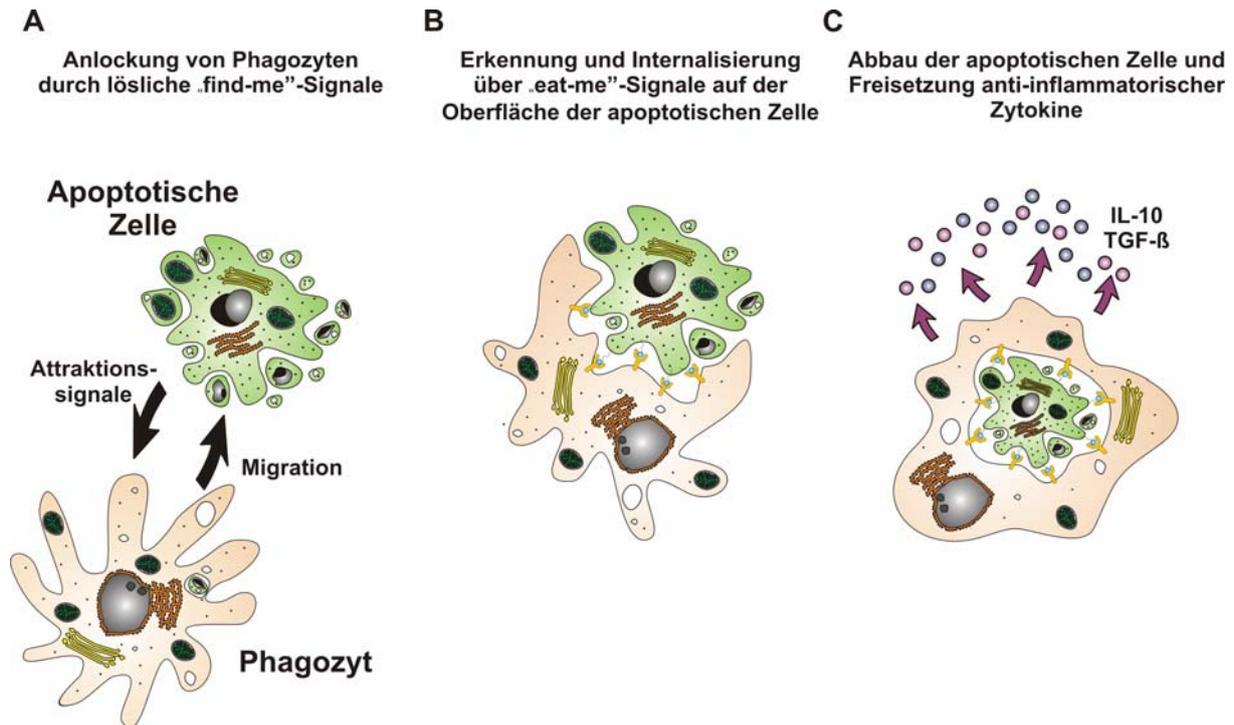


Abbildung 1.5: Dreistufiger Prozess der Eliminierung apoptotischer Zellen.

(A) Die apoptotische Zelle setzt lösliche Attraktionssignale frei, die zur Anlockung professioneller Phagozyten führen.

(B) Durch den engen Kontakt zwischen apoptotischer Zelle und Phagozyt kommt es zur Ausbildung der phagozytotischen Synapse. Die sterbende Zelle präsentiert dabei eine Vielzahl an „eat-me“-Signalen auf ihrer Oberfläche, die vom Phagozyten direkt oder indirekt über Brückenmoleküle erkannt werden können. Anschließend kommt es zur Internalisierung der apoptotischen Beute durch den Phagozyten.

(C) Nach der Internalisierung der apoptotischen Zellen werden diese vom Phagozyten abgebaut. Dieser setzt gleichzeitig vermehrt anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , frei und verhindert dadurch entzündliche Prozesse im umgebenden Gewebe. Abbildung modifiziert nach Lauber et al. (Lauber et al., 2004).

Störungen bei der Eliminierung apoptotischer Zellen können in höheren Organismen schwerwiegende Folgen haben. So können nicht-eliminierte apoptotische Zellen eine Quelle für Autoantigene sein und durch die Induktion der Produktion von Autoantikörpern systemische Autoimmunreaktionen hervorrufen (Casciola-Rosen et al., 1994; Rosen und Casciola-Rosen, 1999). In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass sowohl Defekte bei der Anlockung von Phagozyten als auch bei der Erkennung und der Degradation apoptotischer Zellen langfristige Auswirkungen auf das Immunsystem haben können. So führt im Mausmodell der *knockout* von C1q, einem der Brückenmoleküle der phagozytotischen Synapse, zur Anhäufung apoptotischer Körperchen, und die betroffenen Mäuse entwickeln ein Multiorgan-Autoimmunsyndrom, das dem humanen systemischen Lupus erythematodes (SLE) ähnlich ist (Botto, 1998; Botto und Walport, 2002). In MFG-E8-*knockout*-Mäusen kommt es durch die Anhäufung nicht-eliminierter Immunzellen zu stark vergrößerten lymphatischen Organen und zur Entwicklung einer durch Autoimmunantikörper hervorgerufenen Glomerulonephritis (Hanayama et al., 2004). Die Maskierung von Phosphatidylserin mit einer dominant negativen Form von MFG-E8 führt ebenfalls zu einer gestörten Phagozytose apoptotischer Zellen und zur Produktion von Autoantikörpern in Mäusen (Asano et al., 2004). Ebenso äußert sich ein Defekt der phagozytären Rezeptor-Tyrosinkinase Mer in einer Anhäufung apoptotischer Zellen und der Entwicklung eines Lupus-ähnlichen Autoimmunsyndroms (Scott et al., 2001). Auch der *knockout* des LPC-Rezeptors G2A führt dazu, dass die Mäuse ein Multiorgan-Autoimmunsyndrom entwickeln, das viele Parallelen

zum humanen SLE aufweist (Le et al., 2001). Eine aktuelle Veröffentlichung belegt, dass auch die unzureichende Degradation internalisierter apoptotischer Zellüberreste Krankheitsursache sein kann. So können Mäuse, die keine DNase II exprimieren, die Nuklei internalisierter apoptotischer Zellen nicht vollständig abbauen und entwickeln eine chronische Polyarthrit, die durch Autoimmunantikörper, wie z.B. anti-CCP-Antikörper (CCP = *cyclic citrullinated peptide*) und Antikörper gegen doppelsträngige DNA, und eine gesteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist (Kawane et al., 2006).

1.6 Annexin I

Annexin I (auch Annexin A1 oder Lipocortin I genannt) gehört zur Proteinfamilie der Annexine und ist ein mittelgroßes amphipatisches Protein mit einer molekularen Masse von 38 kDa. Beim Menschen sind 12 Mitglieder der Annexin-Familie bekannt (A1-A13). Diese erfüllen unterschiedlichste Funktionen und sind z.B. an der Membran-Organisation oder der Regulation des intrazellulären Calcium-Spiegels beteiligt (Gerke und Moss, 2002). Allen Annexinen ist die Fähigkeit gemeinsam, Calcium und Phospholipide zu binden. Die Bindung erfolgt über die so genannten Annexin-Boxen, die innerhalb der Annexin-Familie sehr stark konserviert sind (Liemann und Huber, 1997; Liemann und Lewit-Bentley, 1995). Annexin I besitzt, ebenso wie die anderen Annexine (außer Annexin VI), vier dieser homologen Domänen (siehe Abbildung 1.6).

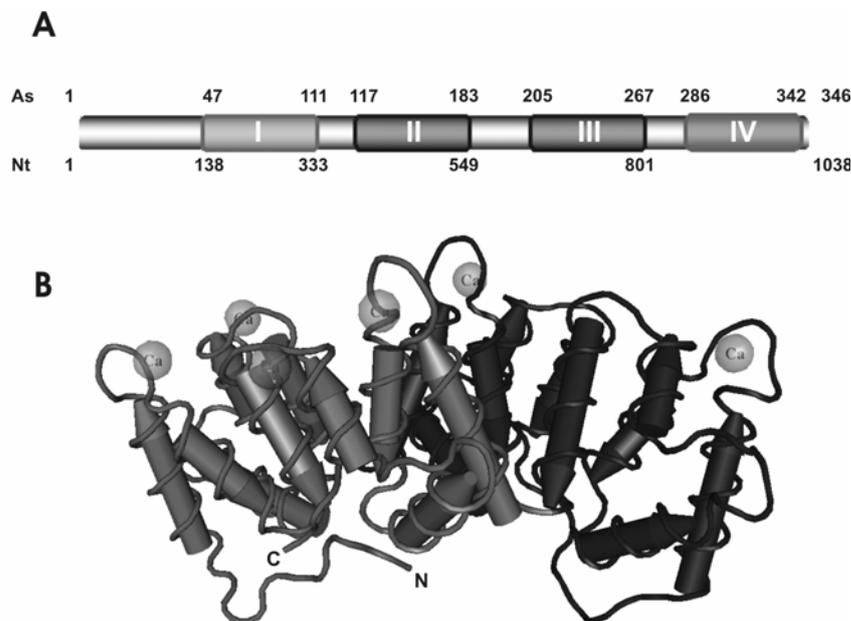


Abbildung 1.6: Struktur des humanen Annexin I.

(A) Schematische Darstellung von Annexin I. Dargestellt ist das monomere Protein (38 kDa) in der linearen Form. Die hervorgehobenen Bereiche (I-IV) markieren die hochkonservierten Calcium- und Phospholipid-bindenden Motive, die so genannten Annexin-Boxen. Oberhalb und unterhalb der Darstellung sind die Positionen der Annexin-Boxen in der Aminosäure- (As)- bzw. Nukleotidsequenz (Nt) angegeben.

(B) 3-D-Darstellung von humanem Annexin I (aa33-346, Pub-Med-Nr. 1AIN). Annexin I besitzt 20 α -Helices und ist dicht gepackt in Form einer gekrümmten Scheibe. Die Calciumbindung über die Annexin-Boxen erfolgt ausschließlich auf der konvexen Seite. Annexin I bindet pro Molekül 6 Calciumatome. Der hydrophobe N-Terminus ist in Abwesenheit von Calcium auf der konkaven Seite ins Proteininnere gerichtet. Bei Bindung von Calcium-Ionen erfährt das Protein eine Konformationsänderung, der N-Terminus wird aus dem Inneren des Proteins verdrängt und wird frei beweglich (dadurch in Röntgenstrukturanalysen nicht abbildbar). Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>

Die unterschiedlichen Funktionen der Annexine kommen durch den für jedes Annexin-Familienmitglied spezifischen N-Terminus zustande. Annexin I besitzt einen etwa 40 Aminosäuren langen N-Terminus, der durch Phosphorylierungen oder proteolytische Prozessierung modifiziert werden kann, wodurch z.B. die Calcium-abhängige Bindung an Membranen geschwächt wird (Wang und Creutz, 1992). Durch seine Eigenschaft, Calcium-abhängig an Phospholipide und dabei bevorzugt an Phosphatidylserin binden zu können, ist Annexin I in der Lage, Membranen zu vernetzen (Rosengarth und Luecke, 2003). Deshalb ist Annexin I an verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. der Zelldifferenzierung und Proliferation, am Membran-Trafficking, an Exo- und Endozytoseprozessen und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Gerke und Moss, 2002; Rescher et al., 2002).

Bekannt ist Annexin I jedoch vor allem als Glucocorticoid-induzierbares Protein mit verschiedenen anti-inflammatorischen Funktionen: So hemmt Annexin I die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) und kann dadurch die Arachidonsäure-Freisetzung und die Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren unterdrücken (Frey et al., 1999; Kim et al., 2001; Solito et al., 1998; Wu et al., 2000b); über eine Interaktion mit anderen Mitgliedern der PLA₂-Familie, wie z.B. der iPLA₂, ist dagegen bis heute nichts bekannt. Zudem verhindert Annexin I auf der Oberfläche von Monozyten und Neutrophilen deren Extravasion in entzündete Gewebe (Perretti et al., 2002; Solito et al., 2000). Neuere Arbeiten zeigen, dass Annexin I außerdem eine Rolle während der Apoptose spielt. Annexin I wird während der Apoptose prozessiert (Debret et al., 2003) und über einen bislang unbekanntem Mechanismus externalisiert (Arur et al., 2003). Dabei scheint sowohl das auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen gebundene als auch das von Phagozyten externalisierte Annexin I eine wichtige Rolle bei der Eliminierung apoptotischer Zellen zu spielen (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004; Maderna et al., 2005). Wahrscheinlich dient Annexin I in diesem Prozess, ähnlich wie die in Abschnitt 1.5.2 erwähnten Faktoren MFG-E8, Gas6 und β 2-GPI, als Brückenmolekül zwischen der Phosphatidylserin-reichen Oberfläche apoptotischer Zellen und dem Phagozyt (siehe Abbildung 1.4).

1.7 Zielsetzung

Die Eliminierung apoptotischer Zellen durch benachbarte Zellen oder professionelle Phagozyten unter Vermeidung der Induktion entzündlicher Reaktionen ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase in mehrzelligen Organismen. Die Freisetzung löslicher Attraktionssignale und die Präsentation von „eat-me“-Signalen auf der Oberfläche apoptotischer Zellen spielen in diesem Prozess eine zentrale Rolle. Dies erscheint umso wichtiger, da die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und die ineffiziente Eliminierung apoptotischer Zellen offensichtlich in engem Zusammenhang stehen (Rosen und Casciola-Rosen, 1999). Insbesondere in höheren Organismen, in denen die sterbenden Zellen und die Phagozyten oft nicht direkt nebeneinander lokalisiert sind, kommt der Freisetzung von löslichen „find-me“-Signalen eine besondere Bedeutung zu. Als ein bedeutendes Attraktionssignal konnte Lysophosphatidylcholin (LPC) identifiziert werden, das durch die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin mittels der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂) entsteht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die iPLA₂ während der Apoptose Caspase-3-abhängig gespalten wird. Die Überexpression des 26 kDa großen Spaltfragments der iPLA₂ führte zwar bei apoptotischen Zellen zu einer gesteigerten Attraktion von Phagozyten, von lebenden Zellen wurde jedoch kein Attraktionssignal freigesetzt. Dies legte den Schluß nahe, dass die

iPLA₂ zwar für die Freisetzung von LPC benötigt wird, dass aber weitere Prozesse während der Apoptose an der Generierung und / oder der Freisetzung des Attraktionssignals LPC beteiligt sind (Lauber et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die folgenden Fragen geklärt werden:

- 1.) Führt die Spaltung der iPLA₂ tatsächlich zu deren Aktivierung und wird die iPLA₂-Aktivität möglicherweise durch Inhibitoren, wie z.B. Annexin I, reguliert?
- 2.) Welche Transportmechanismen führen während der Apoptose zur Freisetzung des Attraktionssignals LPC?
- 3.) Über welche Rezeptoren wird auf Seite der Phagozyten die LPC-vermittelte Migration stimuliert?
- 4.) Welche Rolle spielt Annexin I als Brückenmolekül in der phagozytotischen Synapse?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Herstellerverzeichnis

Apothek des Universitätsklinikums Tübingen

Mitomycin C

Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA

Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS)

Axxora, Lausanne, Schweiz

Anti-PARP-Antikörper

Bachem, Heidelberg

Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon (zVAD-fmk)

Biomol, Hamburg

Anti-CD95-Antikörper (Maus IgM, Klon CH11), anti-Annexin-I-Antikörper

BioRad, München

Bradford-Reagenz, Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Kaninchen-anti-Ziege-IgG (H+L), Substratlösung ("TMB Peroxidase EIA Substrat Kit")

Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF₃), Calcein, Ionomycin, Lipid Peroxidation Assay Kit II

Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA

Bromenollacton (BEL), anti-iPLA₂-Antikörper, cPLA₂-Assay-Kit

Eurogentec, Seraing, Belgien

Mastermixe für quantitative *real time*-PCR (qPCRTM Mastermix Plus, qPCRTM Mastermix Plus for SYBR[®] Green I)

Fermentas, St. Leon-Rot

Molekulargewichtsmarker ("Page Ruler Prestained Protein Ladder" und "Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus")

GE Healthcare, Freiburg

Molekulargewichtsmarker (Full Range Rainbow Marker), Pd(N)₆ Random Hexamere zur reversen Transkription, PVDF-Membranen (Hybond^P-ECL-Membran), Westernblot-ECL-Detection-Kit

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

Amplex Ultra Red, Bis-BODIPY®FL C₁₁-PC (BBPC), CM-H₂DCFDA (5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Acetylerster), HBSS-Medium, HEPES, Penicillin-Streptomycin, RPMI-1640-Medium, OptiMEM-Medium, Reverse Transcriptase ("SuperscriptTM II RNaseH⁺"), LipofectaminTM2000 Transfektionsreagenz, Stealth siRNA (gegen ABCA1, ABCA7, Annexin I und G2A)

Macherey und Nagel, Düren

RNA-Isolierungskit („Nucleo Spin RNA“), Maxi-Plasmid-Reinigungskit ("Nucleobond AX 500" Kit)

Milipore Corporation, Bedford, MA, USA

Millex-Sterilfilter mit 0,2-0,8 µm Porengröße

Neuroprobe, Inc., Gaithersburg, MD, USA

Doppelkammerplatten für Transmigrationstests (96-well-Format "ChemoTX")

Novus Biological, Littleton, CO, USA

Anti-ABCA1-Antikörper

PAA Laboratories, Cölbe

Fötale Kälberserum (FCS)

Promega, Mannheim

Desoxy-Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RnasIn

R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

SDF-1 α

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Aprotinin, FuGENETM 6 Transfektionsreagenz, Leupeptin, Pepstatin, Staurosporin

Roth, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Chloroform, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA), Natriumdodecylsulfat (SDS), Rinderserumalbumin (BSA), Tetraethylmethyldiamin (TEMED), Triton X-100

Schleicher und Schüll, Dassel

Filtermembranen (Kollodiumhülsen), 0,22µm-, 0,45µm-, 0,8µm Sterilfilter, GB002 Filter-Papier

Sigma, Deisenhofen

Ampicillin, anti-FLAG-Antikörper, anti-FLAG M2-Agarose, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Etoposid, fettsäurefreies Rinderserumalbumin, Glycerin, Glycerol-3-Phosphat-Oxidase, Glycerophosphorylcholin(GPC)-Phosphodieserese, Kanamycin, Natriumfluorid, Natriumvanadat, Natriumpyrophosphat, Nonidet P-40, Peroxidase, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat (PMA), PKH26 und PKH67 Fluoreszenz Färbekits, Propidiumiodid (PI), α -Tocopherol, Tween-20

Alle übrigen Reagenzien wurden in reinsten Form (p.a.), falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper.

Name	Beschreibung	Hersteller
Anti-ABCA1	Polyklonaler Hase-Antikörper, erkennt die Vollängenform des ABCA1-Transporters (p220) Immunogen: aa1201-1211, Reaktivität: Mensch, Maus	Novus Biological
Anti-Annexin I	Monoklonaler Maus-Antikörper IgG ₁ , Klon 29 Erkennt die Vollängenform des humanen Annexin I (p38) Immunogen: Vollängenform, Reaktivität: Mensch, Hund	BD Biosciences
Anti-CD95	Maus-Antikörper IgM, Klon CH11 Bindet an den humanen Todesrezeptor CD95 (p43) auf verschiedenen Zellen und induziert dadurch Apoptose Immunogen: FS-7, Reaktivität: Mensch	Biozol
Anti-FLAG	Monoklonaler Maus-Antikörper, der das FLAG-Tag von Fusionsproteinen erkennt (Sequenz: DYKDDDDK)	Sigma
Anti-GFP	Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern IgG ₁ , Klone 7.1 und 13.1, erkennt das GFP des <i>Aequorea victoria</i> (p27), das als Reportermolekül in heterologen Systemen überexprimiert wird, erkennt auch das modifizierte EGPF	Roche
Anti-G2A	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der humanes G2A erkennt (p42-46), Reaktivität: Maus, Mensch, Ratte	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NHE-1	Monoklonaler Maus-Antikörper, erkennt die p92 Vollängenform von humanem NHE-1 Reaktivität: Mensch, Hund, Ratte, Maus	BD Biosciences (Transduction Labs)
Anti-iPLA ₂	Polyklonaler Hase-Antikörper, der die humane iPLA ₂ erkennt Immunogen: aa 557-576, Reaktivität: Mensch, Maus, Hamster, Ratte, Rind	Cayman Chemical
Anti-PARP	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die p116-Form und die	Axxora

Name	Beschreibung	Hersteller
	prozessierte p85-Form von humanem PARP erkennt (Immunogen: aa 216-375) Reaktivität: Mensch, Maus, Ratte, Hamster, Affe	

2.1.3 Plasmidkonstrukte

Die in der vorliegenden Arbeit zur transienten eukaryontischen Expression verschiedener Proteine verwendeten Plasmidkonstrukte wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Sie standen bereits als gereinigte Plasmid-DNA-Stocklösungen bzw. in Form von Bakterien Glycerin-Dauerkulturen (alle in *E.coli* XL-1 Blue) zur Verfügung. Abbildung 2.1 zeigt den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N1 in seiner zirkulären Form.

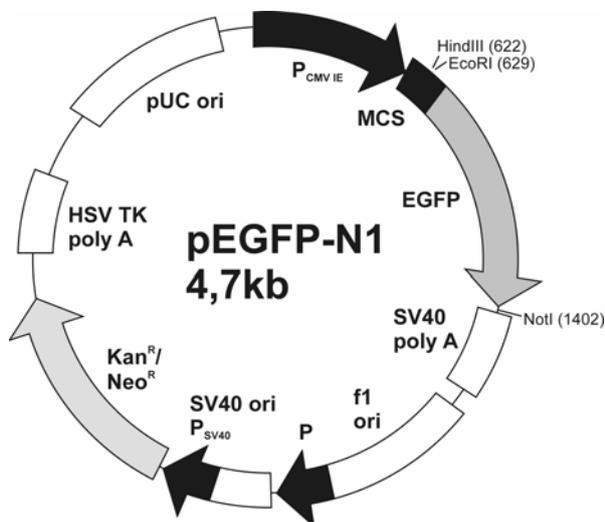


Abbildung 2.1: Vektorkarte von pEGFP-N1.

Kan^R/Neo^R (Kanamycin-Resistenz), MCS (Klonierungsregion), EGFP (*enhanced green-fluorescent protein*) P_{CMV IE} (Cytomegalovirus-Promotor), P_{T7 lac} (T7-Promotor, IPTG-induzierbar), lacI^q (lac-Repressor), f1 ori, SV40 ori, pUC ori (DNA-Replikationsursprünge), SV40 poly A (Polyadenylierungssignal des *Simian Virus 40*) HSV TK poly A (Polyadenylierungssignal des Tyrosinkinasegens von Herpes-Simplex-Virus). Quelle: www.clontech.com; Protokoll #PT3027-5

pEGFP-N1[Flag-iPLA₂ aa1-806]

Die cDNA der calciumunabhängigen Phospholipase A₂ wurde aus der humanen Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF7 in die EcoRI/HindIII-Schnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP-N1 kloniert, ohne mit dem vektoreigenen EGFP fusioniert zu werden. Die rekombinante iPLA₂ trägt ein N-terminales Flag-Tag.

pEGFP-N1[Flag-iPLA₂ aa514-806]

Die cDNA der calciumunabhängigen Phospholipase A₂ Aminosäureregion 514-806 wurde aus MCF7 Zellen in die HindIII/NotI-Schnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP-N1 kloniert, ohne mit dem vektoreigenen EGFP fusioniert zu werden. Die rekombinante iPLA₂ trägt ein C-terminales Flag-Tag.

pEGFP-N1[Flag-iPLA₂ aa514-733]

Die cDNA der calciumunabhängigen Phospholipase A₂ Aminosäureregion 514-733 wurde aus MCF7 Zellen in die HindIII/NotI-Schnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP-N1 kloniert, ohne mit dem vektoreigenen EGFP fusioniert zu werden. Die rekombinante iPLA₂ trägt ein C-terminales Flag-Tag.

pEGFP-N1[FLAG-iPLA₂ 1-512]

Die cDNA der calciumunabhängigen Phospholipase A₂ Aminosäureregion 1-512 wurde aus MCF7 Zellen in die HindIII/NotI-Schnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP-N1 kloniert, ohne mit dem vektoreigenen EGFP fusioniert zu werden. Die rekombinante iPLA₂ trägt ein C-terminales Flag-Tag.

pEGFP-N1[hAnnexI]

Die aus MDA-Zellen amplifizierte cDNA von humanem Annexin I wurde in die BamH1-Schnittstelle des Expressionsvektors pEGFP-N1 eingesetzt. Für die vorliegende Arbeit standen Plasmidkonstrukte mit verschiedenen Anxl-Teilfragmenten in gereinigter Form zur Verfügung:

- pEGFP-N1[hAnnexI nt1-138]
- pEGFP-N1[hAnnexI nt1-333]
- pEGFP-N1[hAnnexI nt1-549]
- pEGFP-N1[hAnnexI nt1-801]
- pEGFP-N1[hAnnexI nt1-1038]
- pEGFP-N1[hAnnexI nt139-1038]

Das exprimierte rekombinante Annexin I ist jeweils am C-Terminus mit EGFP fusioniert.

2.1.4 Gereinigte Proteine

Die im Folgenden aufgelisteten und in der vorliegenden Arbeit verwendeten gereinigten rekombinanten Proteine wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigt. Alle Stocklösungen wurden bei -70°C gelagert.

hCaspase-3-His₆

Humane rekombinante Caspase-3 wurde aus mit pET23[Casp3] transformierten *E.coli* BL21(DE3) affinitätschromatographisch aufgereinigt und stand bereits als enzymatisch aktive Stocklösung in 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NaCl, 50% Glycerol zur Verfügung. Das Protein war C-terminal mit einem Hexahistidin-Tag fusioniert.

His₆-hAnnexin I

Humanes, rekombinantes Annexin I wurde aus mit pET15b[hAnnexI] transformierten *E.coli* BL21(DE3) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Es wurden drei verschiedene Annexin-I-Fragmente aufgereinigt, die alle N-terminal mit einem Hexahistidin-Fusions-Tag und einer Thrombin-Spaltkonsensussequenz fusioniert waren. In Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Fusionsproteine aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verwendete hAnnexin-I-His₆-Fusionsproteine

Name	aufgereinigt aus	Bemerkungen
hAnnexin-I-His ₆ (aa1-346)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) pET15b[hAnnexI nt1-1038]	Volllängenprotein in 30 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 20% Glycerol
hAnnexin-I-His ₆ (aa1-46)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) pET15b[hAnnexI nt1-138]	N-terminales Fragment in 30 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 20% Glycerol
hAnnexin-I-(His ₆ (aa47-346)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) pET15b[hAnnexI nt139-1038]	Core-Fragment in 30 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 20% Glycerol

hAnnexin-I-Cy2TM

Mit Hilfe von immobilisiertem Thrombin (Merck) wurde bei den in Tabelle 2.1 aufgelisteten rekombinanten humanen Annexin-I-Fragmenten das N-terminale Hexahistidin-Tag enzymatisch entfernt. Danach wurden die Annexin-I-Fragmente mit dem FluoroLinkTM-Ab Cy2TM Labelling Kit von Amersham Biosciences Cy2TM-markiert. Der Farbstoff besaß ein Emissionsmaximum bei 506 nm und ließ sich im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) im FL1-Filter (530 nm) detektieren. Alle Stocklösungen waren PBS gepuffert und enthielten 0,1% Azid. Sie wurden bei -70°C gelagert.

His₆-hLysophospholipase A1

Humane rekombinante Lysophospholipase A1 wurde aus mit pET15b[hLPL-A1] transformierten *E.coli* BL21(DE3) affinitätschromatographisch aufgereinigt und stand als Stocklösung in TBS mit 10 % Glycerin zur Verfügung. Das Protein war N-terminal mit einem Hexahistidin-Tag fusioniert.

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgelisteten modifizierten *short interfering* (si)-RNA-Oligonukleotide wurden alle von Invitrogen Life Technologies bezogen („stealthTM RNAi“), in lyophilisierter Form geliefert und mit DEPC-behandeltem Wasser Stocklösungen von 100 µM hergestellt. Diese wurden bei -70°C gelagert. Die Nukleotid-Sequenzen der verwendeten siRNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Sequenzen der stealthTM RNAi-Oligonukleotide.

Ziel-mRNA (Start-Nukleotid)	Sense RNA-Sequenz 5'-3'
ABCA1 (nt3216)	GGAGCUGCUGCUGAAAUACCGACAA
ABCA7 (nt426)	ACCAACCAAGCAGUCUCCACUGGAA
ABCA7 (nt1676)	UCUACUCCGUGACACUGACAGUGAA
Annexin I (nt148)	GCCUUGCAUAAGGCCAUAAUGGUUA

Annexin I (nt893)	GGAUUAUGGUUCCCGUUCUGAAAU
Annexin I Kontrolle	GGAUAGGUUCUCCUGCUGUAUUAU
G2A (nt280)	ACGCUGCCACUCUGGGUCAUCAUA
G2A (nt550)	GAGACCUGCUUUGACAUGCUGCAGA
G2A Kontrolle	ACGCCGUCAGUCUGGUACUCCUAUA
GPR4 (nt59)	CGCCAUCCCUCUACAUCUUUGUCAU
GPR4 (nt268)	UGCAAGCUCUUUGGGUUCAUCUUCU
GPR4 Kontrolle	CGCCUCCCUAUACCUUUGUUACCAU

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Material

RPMI-1640 Medium (Invitrogen Life Technologies)	
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10.000 U/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt.
HEPES-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	1 M HEPES Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt.
10x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma)	5 g/l Trypsin 2 g/l EDTA 0,9% Natriumchlorid Für den Gebrauch wurde die Lösung 1:10 in PBS (Invitrogen Life Technologies) verdünnt.
Fötale Kälberserum (PAA Laboratories)	Vor Gebrauch wurde das Serum für 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Durchführung

Alle Zelllinien wurden, falls nicht anders vermerkt, in Kulturflaschen (50 - 800 mL) oder Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, oder 96-Well-Format) bei 37°C mit 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gezüchtet. Die Suspensionszelllinien wurden alle 2 - 3 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt und passagiert. Adhärente Zelllinien wurden 1 - 2mal pro Woche nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10 passagiert.

Die humane Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF7, die stabil mit einem Expressionsvektor für humane Caspase-3 oder mit dem leeren Kontrollvektor transfiziert worden ist, wurde freundlicherweise von

Prof. Dr. Reiner U. Jänicke und Prof. Dr. Alan Porter (National University of Singapore, Singapore) zur Verfügung gestellt.

Die humane Monozyten-Zelllinie U937 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ralph Hass (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Die humane Monozyten-Zelllinie U937, die stabil die murine Form des G2A-Rezeptors exprimiert, und die mit leerem Kontrollvektor transfizierten U937-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Caius Radu (University of California, Los Angeles) zur Verfügung gestellt.

Eine detaillierte Aufstellung der verwendeten Zelllinien und Kulturmedien zeigt Tabelle 2.4.

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien.

Name	Beschreibung	Kulturmedium
Jurkat (J16)	Humane T-Zelllinie (Subklon 16), in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10 mM HEPES
MCF7 _{vektor}	Humane Mamma-Karzinom-Zelllinie, Caspase-3 defizient, stabil mit Kontrollvektor transfiziert, adhärent	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10 mM HEPES
MCF7 _{casp3}	Humane Mamma-Karzinom-Zelllinie, stabil transfiziert mit Caspase-3, adhärent	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10 mM HEPES
MDA-MB 231	Humane Mamma-Karzinom-Zelllinie, adhärent	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10 mM HEPES
THP-1	Humane Monozyten-Linie, in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10 mM HEPES
U937	Humane Monozyten-Zelllinie, in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10mM HEPES
U937 _{vektor}	Humane Monozyten-Zelllinie, stabil mit Kontrollvektor transfiziert, in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10mM HEPES
U937 _{G2A}	Humane Monozyten-Zelllinie, stabil transfiziert mit murinem G2A, in Suspension	RPMI 1640, 10% FCS, 100U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin, 10mM HEPES

2.2.2 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Die Kryokonservierung eukaryontischer Zellen wurde mit DMSO als Gefrierschutzmittel durchgeführt. DMSO unterdrückt die Ausbildung von Wasserkristallen während des Einfrierens und verhindert damit die Zerstörung der Zellwand. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Zellsediment in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert (max. 20 - 30 x 10⁶ Zellen/mL) und in 1 mL großen Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden die Zellen zunächst für ca. 48 h bei -80°C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt. Aufgrund der toxischen Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur wurden alle Einfrierschritte rasch und auf Eis durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt, einmal mit 20 mL Zellkulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

2.2.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Zum Einbringen von Fremd-DNA bzw. RNA in Säugerzellen, die in Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion entweder in Form einer Lipofektion mit Hilfe der Lipofektionsagentien FuGENE™6 (Roche) oder Lipofectamin™2000 (Invitrogen Life Technologies) oder durch Elektroporation mit Hilfe des Gene Pulser II-Elektroporators (BioRad) durchgeführt.

Der genaue Transfektionsmechanismus ist bei der Lipofektion nicht geklärt, erfolgt aber vermutlich durch Endozytose der DNA- bzw. RNA-Liposomen-Gemische (eine Mischung aus polykationischen Lipiden zur Bindung von DNA oder RNA und neutralen Lipiden). Besonders bei adhärennten Zellen lassen sich hierdurch oftmals Transfektionseffizienzen von über 50% erzielen (Herstellerangaben).

Für Suspensionszellen hat sich die Transfektion durch Elektroporation als geeignete Methode erwiesen. Hierbei werden die Zellen für kurze Zeit einem elektrischen Feld ausgesetzt, durch das die Plasmamembran der Zellen permeabel gemacht wird. Dadurch kann in der Suspension befindliche Fremd-DNA oder RNA aufgenommen werden.

Material

Plasmid-DNA	Plasmid-Maxiprep-gereinigt, 0,2 - 2 µg/µl
Stealth™ RNAi (Invitrogen Life Technologies)	100µM in DEPC-behandeltem H ₂ O
FuGENE™6 (Roche)	3 µl pro 1 µg DNA (für 3 x 10 ⁵ Zellen)
Lipofectamin™2000 (Invitrogen Life Technologies)	2,5 - 5µL für 50 - 100pMol siRNA (3 x 10 ⁵ Zellen)
OptiMEM (Invitrogen Life Technologies)	
1x PBS (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Serum-freies Medium (Invitrogen Life Technologies)	
Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	Supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben

Durchführung

Zur Lipofektion wurden 3 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung in 6-well-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Zur Vorbereitung des DNA-Liposomen-Gemisches mit FuGENE™6 wurde 1 µg Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden pro Transfektionsansatz 97 µl serumfreies Medium mit 3 µl FuGENE™6-Reagenz versetzt und für 5 min inkubiert. Dieses Gemisch wurde tropfenweise zur vorgelegten Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Zellkulturmedium erneuert und abschließend das DNA-Liposomengemisch tropfenweise über die Kulturzellen verteilt. Nach 12 h Transfektionszeit im Brutschrank wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen wie angegeben behandelt.

Für die Transfektion von Plasmid-DNA mit LipofectaminTM2000 wurde 1 µg Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 50 µL serumfreiem Medium gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden pro Transfektionsansatz 50 µL serumfreies Medium mit 3 µL LipofectaminTM2000-Reagenz gemischt, für 5 min inkubiert und dann zur Plasmid-DNA-Lösung gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 mL PBS gewaschen, 1400 µL serumfreies Medium zugegeben und 100 µL des DNA-Liposomengemisches tropfenweise über die Kulturzellen verteilt. Nach 5 h Transfektionszeit im Brutschrank wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen bis zur weiteren Behandlung kultiviert.

Zur Transfektion von siRNA mit LipofectaminTM2000 wurden 250 µL serumfreies Medium pro Transfektionsansatz in einem 50mL Falcon-Reaktionsgefäß mit 2,5 oder 5 µL LipofectaminTM2000 versetzt und 5 min inkubiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 250 µL serumfreies Medium mit 0,5 - 1 µL siRNA (50 - 100 pMol) vorgelegt, die LipofectaminTM2000-Suspension langsam zugegeben, gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 mL PBS gewaschen und 500 µL des siRNA-Liposomengemisches zugegeben. Nach 5h Transfektionszeit wurden die Zellen auf normales Kulturmedium umgestellt und bis zur weiteren Behandlung im Brutschrank kultiviert.

Zur Elektroporation von Suspensionszellen wurden diese in kaltem OptiMEM gewaschen und damit auf eine Dichte von 1×10^7 Zellen/mL eingestellt. In jede Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, 0,4 cm Spaltbreite, BioRad) wurden 10 µL der 100 µM siRNA-Stocklösung vorgelegt, 500 µL Zellsuspension zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit einer Feldstärke von 800 µF und 250 V durchgeführt, was einer Pulszeit von 20 - 40 Millisekunden entspricht. Danach wurden die Zellen für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in 10 mL Kulturmedium in eine Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Behandlung im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Apoptose-Induktion und Produktion von chemotaktisch aktiven Zellkulturüberständen

In der vorliegenden Arbeit wurde Apoptose durch verschiedene Stimuli induziert. Die Stocklösungen der verschiedenen Apoptose-Stimuli und Inhibitoren wurden bei -70°C gelagert.

Material

AACOCF ₃ , cPLA ₂ -Inhibitor (Calbiochem)	Stocklösung 10 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 20 µM
Anti-CD95-Antikörper Maus IgM, Klon CH11 (Biozol)	Apoptosestimulus, Agonistischer Antikörper Stocklösung 500 µg/mL in PBS Finalkonzentration 100 ng/mL
Bromenolacton, iPLA ₂ -Inhibitor (Cayman Chemical)	Stocklösung 10 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 1 - 20 µM
Etoposid, Zytostatikum (Calbiochem)	Stocklösung 20 mg/mL in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 25 µg/mL
Glyburid, ABCA-Inhibitor (Merck)	Stocklösung 20 mM in DMSO/Ethanol (frisch angesetzt)

	Finalkonzentration 1 - 100 μM
Ionomycin, Calcium-Ionophor (Calbiochem)	Stocklösung 2 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 4 μM
Mitomycin C, Zytostatikum (Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen)	Stocklösung 1 mg/mL in H ₂ O bidest. Finalkonzentration 25 $\mu\text{g/mL}$
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Phorbol ester PMA (Calbiochem)	Stocklösung 80 μM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 1 - 80 nM
Sephadex-G15 (Amersham Pharmacia)	Es wurden PBS-äquilibrierte Säulen mit einem Gelbett von 2 mL verwendet
Staurosporin, Breitband-Kinase-Inhibitor (Sigma)	Stocklösung 2,5 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 2,5 μM
α -Tocopherol (Vitamin E) (Sigma)	Stocklösung 100 mM in Ethanol Finalkonzentration 1 - 100 μM
Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	Supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben
zVAD-fmk, Breitband-Caspase-Inhibitor (Bachem)	Stocklösung 20 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 100 μM

Durchführung

Im Fall der Zytostatika- oder Staurosporin-vermittelten Apoptose wurden die Stimuli aus hochkonzentrierten Stocklösungen dem serumfreien Zellkulturmedium zugesetzt und die Zellen für die angegebenen Zeiten in diesen Medien inkubiert.

Die UV-Bestrahlung von adhärenenten Kulturzellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

2 x 10⁶ Zellen pro Vertiefung wurden in 6-well-Platten ausplattiert und bis zur Adhärenz im Brutschrank kultiviert. Zur UV-Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch 2 mL PBS ersetzt. Die Zellen wurden mit 10 mJ/cm² im UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ohne Kulturplattendeckel bestrahlt. PBS wurde durch 2 mL serumfreies RPMI-1640-Medium ersetzt und die Zellen für die angegebenen Zeiten im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in 2mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und Zelldebris durch 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 g entfernt. Die zentrifugierten Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bis auf weiteres bei -70°C gelagert.

Inhibitoren wurden 30 min vor der Apoptose-Induktion dem Zellkulturmedium zugesetzt und bis zur Stimulation im Brutschrank inkubiert. Vor der Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2mL Inhibitor- und Stimulus-haltigem serumfreiem Medium für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert.

In den Experimenten, in denen verschiedene pharmakologische Reagenzien zur Produktion der chemotaktisch aktiven Überstände eingesetzt worden sind, wurden die zentrifugierten Zellkulturüberstände zusätzlich über Sephadex-G15-Säulen (Gelbettvolumen 2 mL) filtriert, um die niedermolekularen Drogen zu entfernen.

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen nach α -Tocopherol-Vorbehandlung wurden die Zellen für 30 h vor UV-Bestrahlung mit unterschiedlichen Mengen an α -Tocopherol im Zellkulturmedium kultiviert. Vor Apoptose-Induktion wurden die Zellen zusätzlich mit PBS gewaschen.

2.2.5 Nekrose-Induktion

Zur Produktion nekrotischer Überstände wurden 2×10^6 MCF7_{casp3} Zellen in 2 mL serumfreiem Kulturmedium 20 min bei 58°C im Wasserbad inkubiert. Die nekrotischen Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000g sedimentiert, die Überstände in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

2.2.6 Phagozytostest

Für die Untersuchung der Phagozytose wurden in der vorliegenden Arbeit die Zelllinien THP-1 und U937 verwendet, da sich diese monozytären Suspensionszellen durch PMA-Zugabe zu adhärenthen phagozytierenden Makrophagen ausdifferenzieren lassen. Makrophagen und apoptotische Zellen bzw. Kontrollzellen, im Folgenden als Beute bezeichnet, wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Phagozytierende Makrophagen, die durch Aufnahme von gefärbter Beute doppelt gefärbt waren, ließen sich im Durchflusszytometer von einfach gefärbten, nicht phagozytierenden Makrophagen unterscheiden. Ebenso ließ sich der Anteil an doppelt gefärbten, also internalisierten Beutezellen ermitteln.

Material

Bovines Serumalbumin (BSA), fettsäurefrei (Sigma)	Stocklösung 1 mg/mL in PBS Finalkonzentration 2 nmol/mL
Fötale Kälberserum (PAA Laboratories)	Vor Gebrauch wurde das Serum für 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert
Humanes Annexin I, rekombinant	Anxl aa1-346, Stocklösung: 200 µg/mL Anxl aa47-346, Stocklösung: 200 µg/mL Anxl aa1-46, Stocklösung: 500 µg/mL Finalkonzentration 2 nmol/mL
PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Merck)	Stocklösung 80 µM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 1 - 10 nM
PKH26 Red Fluorescent Färbekit (Sigma-Aldrich)	2 µM PKH26 für 1×10^7 Zellen/mL
PKH67 Green Fluorescent Färbekit (Sigma-Aldrich)	2 µM PKH67 für 1×10^7 Zellen/mL
Serumfreies Medium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben, FCS-frei
1x TBS	50 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 5 mM Calciumchlorid bzw. 10 mM EDTA pH 7,4
1x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)	10x Trypsin/EDTA-Lösung wie unter 2.2.1 angegeben verdünnt

Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies) supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben

Im Folgenden wird die generelle Versuchsdurchführung geschildert. Je nach Fragestellung gab es jedoch leichte Abwandlungen in der Durchführung (siehe dort).

Vorbereitung der Makrophagen

Etwa 2,5 Tage vor dem Phagozytostest wurden die mononukleären THP-1 und U937 Zellen mit grünem PKH67-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff mit langen aliphatischen Resten, mit welchen sich das Molekül in die Zellmembran einlagern kann. Die Zellfärbung ist nicht homogen, es entstehen vielmehr Farbflecken auf der Zelloberfläche. Der Farbstoff ist nicht toxisch und in Zellen bis zu drei Wochen stabil. Pro Färbeansatz wurden 2×10^7 Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und in 1 mL Diluent C, einer isoosmotischen wässrigen Lösung ohne physiologische Salze oder Puffern, resuspendiert. In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde 4 μM PKH-Farbstoff in 1 mL Diluent C angesetzt und zu der vorgelegten Zellsuspension gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und die Färbereaktion durch Zugabe von 2 mL FCS abgestoppt. Nach einer weiteren kurzen Inkubation bei RT wurden die gefärbten Zellen dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen und in eine 24-well-Platte mit je 1×10^5 Zellen in 500 μl Zellkulturmedium pro Kavität ausplattiert. Zur Ausdifferenzierung der THP-1 Makrophagen wurde 1 nM PMA zugegeben, den U937 Zellen wurde 10 nM PMA zugesetzt. Nach 16 h Inkubation im Brutschrank wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen für weitere 2 Tage ohne PMA-Zusatz kultiviert.

Vorbereitung der Beute

Jurkat und THP-1 Zellen wurden direkt vor der Apoptose-Induktion nach dem gleichen Protokoll wie die Makrophagen (siehe oben) mit rotem PKH26-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Für die Apoptose-Induktion wurden die gefärbten Zellen in PBS aufgenommen und mit 10 mJ/cm^2 UV-Licht (siehe 2.2.4) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit im Brutschrank in serumfreiem Medium kultiviert.

Phagozytose und durchflusszytometrische Analyse

Der Phagozytostest wurde in 24-well-Platten durchgeführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium auf den adhärennten THP-1 und U937 Zellen gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Je nach Fragestellung wurden die Beutezellen vor der Ko-Inkubation mit den Makrophagen zusätzlich mit EGTA- oder CaCl_2 -haltigem TBS-Puffer gewaschen bzw. mit aufgereinigtem rekombinantem Annexin I beladen. Anschließend wurde die Beute im angegebenen Verhältnis zu den Makrophagen gegeben. Das finale Volumen betrug 500 μl . Die Zellen wurden für die angegebene Zeit bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Überstände mit der nicht phagozytierten Beute abgenommen, die adhärennten Makrophagen nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung aus der 24-well-Platte gelöst und mit den jeweiligen Überständen vereinigt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) analysiert. Makrophagen und Beute ließen sich anhand ihrer unterschiedlichen Färbung gut unterscheiden. Zur Berechnung des Phagozytose-Index wurde sowohl der Anteil an Makrophagen bestimmt, der Beute phagozytiert hatte, als auch der

Prozentsatz internalisierter, also doppelt gefärbter Beutezellen. Der Phagozytose-Index wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Prozent doppelt gefärbte Phagozyten} \times \frac{(\text{Prozent doppelt gefärbte Beutezellen} / 100 * \text{Anzahl eingesetzter Beutezellen})}{(\text{Prozent doppelt gefärbte Phagozyten} / 100 * \text{Anzahl eingesetzter Phagozyten})}$$

2.2.7 PLA₂-Aktivitätstest

Phospholipasen A₂ hydrolysieren Phospholipide von Zellmembranen und sind damit wesentlich am Ab- und Umbau von Phospholipiden und der Generierung von Lysophospholipiden beteiligt. Zur Messung ihrer Aktivität kann die Spaltung fluorogener Substrate genutzt werden, mit denen Zellen zuvor beladen werden. Die Messung der Aktivität erfolgt durchflusszytometrisch, hierbei wird die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das PLA₂-Substrat Bis-BODIPY[®]FL C₁₁-PC (BBPC) verwendet. BBPC ist eine modifizierte Form von Phosphatidylcholin, die anstelle der Acyl-Seitenketten mit zwei BODIPY-Fluorophoren verestert ist. Durch die räumliche Nähe der beiden fluorogenen Seitenketten wird im ungespaltenen Molekül eine starke Eigenfluoreszenz unterdrückt. Wird eine der Seitenketten abgespalten, entstehen zwei fluoreszierende Produkte, deren Signal im Durchflusszytometer gemessen werden kann.

Material

Bis-BODIPY [®] FL C ₁₁ -PC (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) (BBPC), (Molecular Probes Invitrogen)	Stocklösung 1 µg/µL in DMSO Finalkonzentration 20 ng/µL
HBSS (Invitrogen Life Technologies)	
1x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)	10x Trypsin/EDTA-Lösung wie unter 2.2.1 angegeben verdünnt

Durchführung

Es wurden $0,5 \times 10^6$ MCF7_{casp3} Zellen pro Kavität in 6-well-Platten ausplattiert und nach Erreichen der Adhärenz für 26 h mit entsprechender Plasmid-DNA transfiziert (siehe 2.2.3). Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung aus der Platte gelöst. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 200 µL HBSS aufgenommen, mit 4 µL BBPC versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen in 500 µL HBSS resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) analysiert. Während der Färbung und der Messung wurde darauf geachtet die Proben keiner starken Lichtexposition auszusetzen. Zur Ermittlung der PLA₂-Aktivität wurde die Zunahme der grünen Fluoreszenz bei 530 nm über die Zeit gemessen und danach die Steigung ermittelt.

2.2.8 Nachweis reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)

Oxidativer Stress kann von außen auf Zellen einwirken, es entstehen jedoch auch während des normalen Zellstoffwechsels reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), die z.B. zur Oxidation von Fettsäuren führen können. Insbesondere während der Apoptose ist die Zelle großem oxidativem Stress ausgesetzt, was zu einer erhöhten Rate an oxidierten Lipiden und einem gesteigerten Lipid- und Phospholipidabbau führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen in vitalen und apoptotischen Zellen bestimmt. Um die intrazelluläre ROS-Produktion zu messen, wurden die Zellen mit dem Farbstoff CM-H₂DCFDA (5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat, Acetylerster) beladen, dessen Fluoreszenz nach seiner Oxidation durch ROS durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte.

Material

CM-H ₂ DCFDA (5-(und-6)-Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat, Acetylerster) (Molecular Probes Invitrogen)	Stocklösung 10 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 10 µM
1x PBS (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Serumfreies Medium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben, FCS-frei
1x Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich)	10x Trypsin/EDTA-Lösung wie unter 2.2.1 angegeben verdünnt
Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben

Durchführung

Zur Messung intrazellulärer ROS wurden 4×10^5 Zellen pro Kavität einer 6-well-Platte für 20 min mit serumfreiem Medium + 10 µM CM-H₂DCFDA bei 37°C inkubiert und dann wie unter 2.2.4 beschrieben durch UV-Bestrahlung Apoptose induziert. Die Zellen wurden für 13 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen, die adhären Zellen nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung aus der 6-well-Platte gelöst und mit den jeweiligen Überständen vereinigt. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) bei 530 nm die grüne Fluoreszenz (F11) analysiert.

2.2.9 Zellbiologische Nachweismethoden des Zelltods

2.2.9.1 Zytofluorimetrischer Nachweis von hypodiploiden Nuklei

Während der Apoptose wird die zelluläre DNA durch DNasen internukleosomale gespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch die Kernporen den Zellkern verlassen, so dass dieser sukzessive DNA verliert. Dieses Phänomen kann man als Messparameter der Apoptose heranziehen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Apoptose anhand der hypodiploiden Nuklei nach der Methode von Nicoletti et al. (Nicoletti et al., 1991). Hierbei werden die Nuklei durch hypotone Zellyse freigesetzt und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Die Quantifizierung der

nukleären DNA-Menge erfolgt durchflusszytometrisch, und alle Zellkerne mit weniger als dem diploiden DNA-Gehalt (G_0/G_1 -DNA-Gehalt) werden als apoptotisch betrachtet.

Material

Hypotoner Lysepuffer	1% (w/v) Natriumcitrat 0,1% (v/v) Triton X-100 50 µg/mL Propidiumiodid in H ₂ O bidest.
----------------------	---

Durchführung

Jeweils $3 - 5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 2×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-well-Platten) für 18 - 24 h mit den angegebenen Apoptose-Stimuli behandelt. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen in hypotonem Lysepuffer für 5 min lysiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz der Zellkerne bei 585 nm im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) analysiert. Die apoptotischen, hypodiploiden Zellkerne mit reduzierter roter Fluoreszenz ließen sich im FL2-Histogramm "links" der diploiden G_0/G_1 -Population prozentual erfassen.

2.2.9.2 Zytofluorimetrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen

Der Nachweis der Zellmembranintegrität erfolgte mittels Propidiumiodid-Färbung der Zellen. Tote Zellen weisen eine permeable Zellmembran auf, durch die Propidiumiodid in die Zelle eindringen und in die nukleäre DNA interkalieren kann. Die resultierende rote Fluoreszenz lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen. Bei dieser Methode kann nicht zwischen Nekrose und der im Rahmen der Apoptose spät auftretenden sekundären Nekrose unterschieden werden.

Material

1x Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	
Propidiumiodid-Färbelösung	5 µg/mL Propidiumiodid in 1x PBS

Durchführung

Jeweils $3 - 5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 2×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-well-Platten) für die angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Apoptose-Stimuli behandelt. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen trypsiniert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min 200 g), in der Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) bei 585 nm analysiert. Die Zellen mit gestörter Membranintegrität ließen sich im FL2-Histogramm als Population mit erhöhter roter Fluoreszenz "rechts" der vitalen Kontrollpopulation prozentual erfassen.

2.2.10 Transmigrationstest

Der Transmigrationstest ist eine Nachweismethode zur Bestimmung des chemotaktischen Potentials verschiedener Substanzen und/oder von Zellkulturüberständen. In einem Doppelkammer-Aufbau wird die zu testende Substanz in der unteren Kammer vorgelegt und durch einen Filter definierter Porengröße von den Testzellen abgetrennt. Dabei wird der Porendurchmesser so klein gewählt, dass die Testzellen nicht passiv "durchfallen" können, sondern sich aktiv hindurchbewegen müssen. Der Testaufbau ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

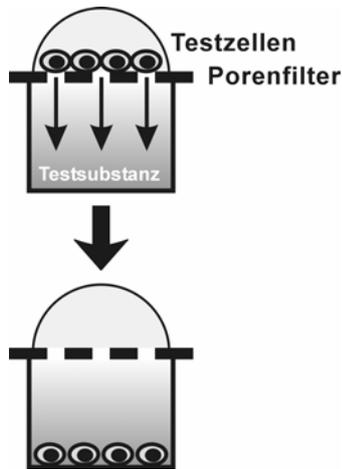


Abbildung 2.2: Aufbau des Transmigrationstests.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Testzellen mit dem grünen Fluorophor Calcein-AM markiert. Dies ermöglicht die prozentuale Quantifizierung der transmigrierten Zellen über die Messung der grünen Fluoreszenz.

Material

Bovines Serumalbumin (BSA), fettsäurefrei (Sigma)	Lyophilisiert Finalkonzentration 0,1 % in serumfreiem Medium
ChemoTX-Platten (Neuroprobe, Inc.)	96-well-Format 8 µm Porendurchmesser 300 µl Fassungsvermögen der unteren Kammer
Calcein-AM-Lösung	1 mg/mL Calcein-AM in DMSO/Ethanol
Lyse-Puffer	25 mM Tris-Phosphat 2 mM EDTA 10% (v/v) Glycerin 1% (v/v) Triton X-100 pH 7,8
Lysophosphatidylcholin (LPC) (Avanti Polar Lipids)	10 mg/mL in Chloroform Finalkonzentration 10 µM
SDF-1α (R&D Systems)	Rekombinantes humanes SDF-1α Stocklösung 50 µg/mL in PBS Finalkonzentration 200 ng/mL
Serumfreies Medium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben, FCS-frei

Durchführung

2 x 10⁶ Testzellen (THP-1 oder U937_{vektor} bzw. U937_{G2A}) pro mL wurden mit 1 µg/mL Calcein-AM in Kulturmedium (RPMI-1640, supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben) für 30 min im Brutschrank gefärbt, einmal in Kulturmedium gewaschen und mit einer Zellkonzentration von 2 x 10⁶ Zellen pro mL in Kulturmedium resuspendiert. Für den Transmigrationstest wurden 50 µl dieser Zellsuspension pro Vertiefung (entspricht 1 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung) eingesetzt.

300 µl der zu testenden Zellkulturüberstände verschiedener Zelllinien wurden in der unteren Kammer der ChemoTX-Platten vorgelegt. Der 8µm-Porenfilter wurde befestigt, 50 µl der gefärbten Zellsuspension vorsichtig aufgebracht und der Testansatz für 120 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Filter vorsichtig entfernt, die transmigrierten Zellen durch Zentrifugation gesammelt (5 min 200 g) und in 100 µl Lysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Messung der grünen Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 508 nm mit Hilfe des Micro Tek FLI-Fluorometers (Bio-Tek Kontron Instruments) durchgeführt. Um den prozentualen Anteil der transmigrierten Zellen zu ermitteln, wurde eine Eichgerade von 0 – 50.000 gefärbten, lysierten Zellen verwendet.

Für die Transmigrationstests mit gereinigtem Lysophosphatidylcholin wurde das entsprechende Volumen der Chloroformlösung in einem Glasröhrchen vorgelegt und das Chloroform unter Stickstoffbegasung abgezogen. LPC wurden dann in serumfreiem RPMI-1640-Medium mit 0,1 % fettsäurefreiem BSA rekonstituiert und zur besseren Lösung für 5 min ultraschallt. Für die Tests mit dem Chemokin SDF-1α wurde dieses in serumfreiem Medium mit 0,1 % fettsäurefreiem BSA verdünnt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Das Prinzip dieses Tests ist die Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine, die eine Veränderung im Absorptionsverhalten des Farbstoffs bewirkt.

Material

5x Bradford-Lösung (BioRad)	Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:5 in H ₂ O bidest. verdünnt.
BSA-Eichgerade	50 - 400 µg/mL BSA (Roth) in PBS

Durchführung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Mikromaßstab in 96-well-Platten durchgeführt. 1 - 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 200 µl 1x Bradford Reagenz versetzt. Bei jeder Messung wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (50 µg/mL bis 400 µg/mL) als interner Standard mitgeführt. Der Abgleich erfolgte gegen einen Reagenzienleerwert. Die Absorptionsmessung wurde im Micro Tek FLI-Fluorometer (Bio-Tek Kontron Instruments) bei 570 nm durchgeführt. Mit Hilfe der

geräteeigenen Software wurden die Daten der BSA-Verdünnungsreihe ausgewertet und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.3.2 Herstellung von Zelllysaten

Zum Nachweis zellulärer Protein mittels SDS-PAGE und zur Präzipitation von Proteinen wurden in der vorliegenden Arbeit Gesamtzelllysate hergestellt. Dabei wurden in einem isotonen Lysepuffer durch Zusatz von Detergenz zelluläre Strukturen zerstört und durch Zugabe von Proteinase-Inhibitoren der weitere Abbau von Proteinen gehemmt.

Material

Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 150 mM Natriumchlorid 200 µM EDTA 200 µM EGTA 3 µg/mL Pepstatin 3 µg/mL Aprotinin 3 µg/mL Leupeptin 20 µg/mL Calpain-Inhibitor 1 20 µg/mL Calpain-Inhibitor 2 2 mM PMSF 1 % Triton X-100
1x PBS (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β-Mercapto-Ethanol

Durchführung

Die entsprechend vorbehandelten Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und mit PBS gewaschen. Die trockenen Pellets von $0,5 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden in 100 µL kaltem Lysepuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation wurden nicht-lysierte Zellbestandteile sedimentiert. Die Lysate wurden entweder zur Präzipitation (siehe 2.3.6) eingesetzt oder für eine SDS-PAGE vorbereitet. Dazu wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt, die entsprechenden Mengen Lysat mit 4x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und einer Westernblot-Analyse unterzogen.

2.3.3 Aufreinigung von FLAG-Fusionsproteinen

In der vorliegenden Arbeit wurde FLAG-iPLA₂ aa1-806 aus Zelllysaten aufgereinigt.

Die Methode beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem zu reinigenden Protein und einem Antikörper, der an einer Gelmatrix immobilisiert wurde. Dadurch ist es möglich aus einer Proteinmischung, wie z.B. Gesamtzelllysaten, ein einzelnes Protein aufzureinigen.

Material

Anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma)	
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,63
IP Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,6 150 mM NaCl 1% Triton X-100
IP Waschpuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10% Glycerin 0,1% Triton X-100
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0
1x PBS + 20% Glycerin	zur Dialyse
Protease-Inhibitoren	3 µg/mL Pepstatin 3 µg/mL Aprotinin 3 µg/mL Leupeptin 2 mM PMSF
Float-A-Lyzer-Dialysierschläuche, 5 mL Volumen (Roth)	
Polypropylen-Säulen mit Fritte (BioRad)	10 mL Fassungsvermögen

Durchführung

Es wurden wie unter 2.2.3 beschrieben Jurkat Zellen durch Elektroporation mit dem pEGFP-N1[FLAG-iPLA₂ aa1-806]-Plasmidkonstrukt transfiziert, die Zellen 24h nach Transfektion geerntet bis zur weiteren Verwendung trocken bei -70°C gelagert. Alle weiteren Schritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Das Pellet von 1 x 10⁹ transfizierten Jurkat Zellen wurde in 10mL IP Lysepuffer mit Zusatz von Protease-Inhibitoren für 10 min lysiert und die Zelldebris durch Zentrifugation abgetrennt. Die Säule wurde mit 1 mL einer 50 %igen anti-FLAG-Agarose-Lösung gepackt und durch Waschen mit H₂O, Elutionspuffer und IP Lysepuffer vorbereitet. Danach wurden 10 mL Zelllysat vorsichtig aufgetragen und mit niedriger Fließgeschwindigkeit über die Säule laufen gelassen. Zum Abspülen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule zuerst mit 40 mL IP Lysepuffer und dann mit 40 mL IP Waschpuffer gewaschen. Eluiert wurde mit 15 x 250 µL Elutionspuffer und jede Fraktion wurde sofort mit 12 µL Neutralisationspuffer behandelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen PBS + 20% Glycerin dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -70°C gelagert.

2.3.4 *In vitro*-Spaltung von Proteinen mit Hilfe gereinigter Caspasen

Mit Hilfe der gereinigten rekombinanten Caspase-3 (2.1.4) wurde in der vorliegenden Arbeit die gereinigte iPLA₂ aa1-806 (siehe 2.3.3) *in vitro* prozessiert.

Material

Gereinigte Caspase-3	Stocklösung 1,25 mg/mL
Gereinigte iPLA ₂ aa1-806	500 µL proteinhaltiges, dialysiertes Eluat von 1 x 10 ⁹ Zellen, Proteinkonzentration unbekannt

1x Reaktionspuffer	37,5 mM HEPES 75 mM Natriumchlorid 7,5% (w/v) D(+)-Sucrose 0,075% (w/v) CHAPS 1,5 mM Calciumchlorid 10 mM DTT pH 7,4
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
zVAD-fmk	20 mM zVAD-fmk (Bachem) in DMSO/Ethanol

Durchführung

Jeweils 20 μ L der gereinigten iPLA₂ aa1-806 wurden mit je 2 μ g der gereinigten Caspase-3 in An- oder Abwesenheit von 500 μ M zVAD-fmk in einem finalen Volumen von 40 μ L 1x Reaktionspuffer unterschiedlich lange bei 37°C auf einem Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ L 4 x SDS-Auftragspuffer gestoppt, für 5 min auf 95°C erhitzt, auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und einer Westernblot-Analyse unterzogen.

2.3.5 Präparation von Membran- und Cytosolfractionen

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Proteinen und der Detektion gering exprimierter Membranproteine kann man Zellkerne, Cytosol und Membranen getrennt präparieren und einer Westernblot-Analyse unterziehen. Das Prinzip dieser Präparationsmethode ist eine hypotone Zellyse und eine anschließende Abtrennung von Zellkernen und zellulären Membranen aus der cytosolischen Fraktion durch Zentrifugation.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der verschiedenen iPLA₂-Fragmente und zum Nachweis des ABCA1-Transporters und des G2A-Rezeptors herangezogen.

Material

PBS	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
1x Puffer A	20 mM HEPES-KOH, pH 7,5 10 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Magnesiumchlorid 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 10 μ g/mL Leupeptin 10 μ g/mL Aprotinin 10 μ g/mL Pepstatin A 0,1 mM PMSF

4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
-----------------------	--

Durchführung

Das trocken bei -70°C gelagerte Pellet von $1 - 1,5 \times 10^7$ Zellen, die wie unter 2.2.3 beschrieben mit verschiedenen iPLA₂-Konstrukten oder siRNA transfiziert worden waren, wurde in 1 mL kaltem Puffer A resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in den Dounce-Homogenisator (Spaltbreite 70 μm) überführt und auf Eis mit 20 Stößen homogenisiert. Nuklei und Zelldebris wurden für 10 min bei 800 g sedimentiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Membranfraktion durch Zentrifugation bei 50.000 g und 4°C für 2 h vom cytosolischen Überstand abgetrennt. Die cytosolische Fraktion wurde abgenommen und die sedimentierte Membranfraktion in 100 – 150 μL Lysepuffer + 5% Triton X-100 (siehe 2.3.2) resuspendiert. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die entsprechenden Volumina der Fraktionen mit 4x SDS-Auftragspuffer versetzt und entweder direkt oder nach 5 minütigem Erhitzen auf 95°C zur SDS-PAGE eingesetzt.

2.3.6 Präzipitationen

Präzipitationstechniken mit Hilfe von Sepharose-Matrizes kann man zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen verwenden. Entweder setzt man dabei einen der Bindungspartner direkt immobilisiert ein, oder man verwendet ein Gelmaterial, an das ein für einen der beiden Bindungspartner spezifischer Antikörper kovalent gebunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Präzipitation von FLAG-getaggten Proteinen und deren Bindungspartnern ein Gelmaterial benutzt, an das ein spezifischer anti-FLAG-Antikörper gekoppelt ist.

Material

Anti-FLAG-M2-Agarose (Sigma)	
Calciumchlorid	Stocklösung 1 M in 1xTBS Finalkonzentration 5 mM
EDTA	Stocklösung 1 M in 1xTBS Finalkonzentration 5 mM
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,63
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,0
8x SDS-Auftragspuffer	500 mM Tris-Hydrochlorid 51,6% (v/v) Glycerin 16,4% (w/v) SDS 0,08% (w/v) Bromphenolblau 8% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
Silikonisierte Reaktionsgefäße, 1,5 mL Volumen	Biozym
Waschpuffer	10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,1% (v/v) Triton X-100 pH 8,0

Durchführung

Pro Präzipitationsansatz wurde das wie unter 2.3.2 beschrieben hergestellte Lysat von 5×10^6 Zellen eingesetzt (500 μ L). Um eine mögliche Calcium-Abhängigkeit der Protein-Interaktionen zu überprüfen, wurde den Lysaten entweder 5 mM Calciumchlorid oder 5 mM EDTA zugesetzt.

Zur Entfernung des Lagerungspuffers wurden 200 μ L des Gelmaterials zunächst mit 1 mL Waschpuffer gewaschen und zur Entfernung möglicher Verunreinigungen mit 1 mL Elutionspuffer eluiert. Es wurden 50 μ L Neutralisationspuffer zugegeben und das Gelmaterial dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 20 μ L anti-FLAG-Agarose zu 500 μ L Lysat und wurde für 1,5 h bei 4°C in Kühlraum auf einem Schüttler durchgeführt. Die Gelmatrix wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und sechsmal mit je 1 mL Waschpuffer unter Zusatz von Calciumchlorid oder EDTA gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden die Proben für 2 min mit je 40 μ L Elutionspuffer inkubiert, das Gelmaterial sedimentiert und die in ein frisches Gefäß überführten Eluate mit 4 μ L Neutralisationspuffer neutralisiert. Die Elution wurde gegebenenfalls wiederholt und die Eluate vereinigt. Die Proben wurden mit 20 μ L 8x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert, bevor sie zur SDS-Gelelektrophorese und anschließender Westernblot-Analyse bzw. Silberfärbung eingesetzt wurden.

2.3.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Hierbei werden die Proteine mit Hilfe von SDS denaturiert und Disulfidbrücken mit β -Mercapto-Ethanol reduziert. Die Anlagerung des anionischen Detergenz SDS an die Polypeptidkette erfolgt proportional zum Molekulargewicht des Polypeptids. Da jedes angelagerte SDS-Molekül die Polypeptidkette mit einer negativen Ladung versieht, ergibt sich für alle Proteine ein nahezu konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis der SDS-Polypeptid-Aggregate, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel allein von der Größe des Polypeptids abhängig ist. Mit Hilfe von geeigneten Molekulargewichts-Markern ist die Größe eines Polypeptids auf diese Weise leicht zu bestimmen.

Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gel- und Puffersystems mit Sammel- und Trenngel wird das Auflösungsvermögen der SDS-PAGE wesentlich erhöht (Laemmli, 1970).

Material

Acrylamid-Lösung (Roth)	29,2% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O bidest.
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O bidest.
TEMED (Roth)	
Sammelgel-Puffer	0,74% (w/v) SDS 1 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8
Trenngel-Puffer	0,384% (w/v) SDS 1,5 M Tris-Hydrochlorid pH 8,8

4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS (Roth) 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
1x Elektrodenpuffer	0,1% (w/v) SDS 1,9 M Glycin 250 mM Tris-Hydrochlorid

Durchführung

Aus den Stocklösungen wurden die Gelmischungen hergestellt. Sie enthielten:

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid	5% (w/v)	8 - 15% (w/v)
Tris-Hydrochlorid pH 6,8	135 mM	-
Tris-Hydrochlorid pH 8,8	-	390 mM
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,1% (w/v)	0,05% (w/v)

Die Polymerisation wurde durch 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 ca. 60 min wurde der Alkohol durch Spülen mit H₂O bidest. entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die zu testenden Proteinlösungen wurden mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x Elektrodenpuffer solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront die untere Gelkante erreicht hatte.

2.3.8 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen wurde nach Rabilloud et al. durchgeführt (Rabilloud et al., 1988). Sie zeichnet sich durch eine 100- bis 1000-fach größere Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung aus (Nachweisgrenze 0,1 - 1 ng Protein pro Bande).

Material

Fixier-Lösung	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure 0,0185% (v/v) Formaldehyd
Thiosulfat-Lösung	0,8 mM Natriumthiosulfat in H ₂ O bidest.
Imprägnier-Lösung	0,2% (w/v) Silbernitrat 0,0278% (v/v) Formaldehyd
Entwickler-Lösung	6%(w/v) Natriumcarbonat 16 μ M Natriumthiosulfat 0,0185% (v/v) Formaldehyd
Stop-Lösung	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure

Durchführung

Nach der SDS-PAGE wurde das Trenngel für die angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Lösungen in einer Schwenkapparatur inkubiert:

Lösung	Zeit
Fixier-Lösung	60 min
Dreimal mit 50% (v/v) Methanol in H ₂ O bidest. waschen, jeweils	20 min
Thiosulfat-Lösung	1 min
Dreimal mit H ₂ O bidest. waschen, jeweils	20 s
Imprägnier-Lösung	20 min
Zweimal mit H ₂ O bidest. waschen, jeweils	30 s
Entwickler-Lösung	Bis Banden sichtbar wurden
Stop-Lösung	10 min
50% (v/v) Methanol in H ₂ O bidest.	2 h

Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

2.3.9 Westernblot

Der Westernblot ist eine Methode zum selektiven Nachweis eines Proteins mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Dazu müssen die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine aus dem Gel zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert werden. Der Nachweis erfolgt auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Primärantikörpern und einem geeigneten Detektionssystem auf der Basis eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran im Nass-Tank-Verfahren durchgeführt und das Peroxidase-basierte "Enhanced-Chemiluminescence" (ECL)-Detektionssystem verwendet.

Material

PVDF-Membran "Hybond ^P -ECL" (Amersham-Pharmacia)	
Filter-Papier (GB002; Schleicher und Schüll)	
Transfer-Apparatur (BioRad)	
Transfer-Puffer	2,93 g/l Glycin 5,28 g/l Tris Base 20% (v/v) Methanol
5% Milchpulver-Lösung	5% (v/v) fettarmes Milchpulver 10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02% (v/v) Triton X-100 pH 8,0
1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100	10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02% (v/v) Triton X-100 pH 8,0
Primärantikörper-Lösung	0,5 - 2 µg/mL in 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100

Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärantikörper-Stocklösung, Peroxidase-markiert (BioRad) 1:4000 verdünnt in 5% Milchpulver
Westernblot-ECL-Detection Kit (Amersham-Pharmacia)	
Hyperfilm-ECL (Amersham-Pharmacia)	

Durchführung

Der Zusammenbau des Blots erfolgte in kaltem Transfer-Puffer. Hierzu wurde die Transferrkassette geöffnet und ein Transferschwamm auf die anodengerichtete Seite der Kassette gelegt. Darauf wurden ein Filter-Papier, die PVDF-Membran, das Gel, zwei Lagen Filterpapier und der zweite Transferschwamm gelegt. Die Kassette wurde geschlossen, in den Transfertank überführt und dieser mit kaltem Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Transfer wurde für 90 - 240 min bei 0,5 A und 4°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver-Lösung bei Raumtemperatur blockiert und der Blot zweimal mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung wurde entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Membran fünfmal für 3 min mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde der Blot weitere 6mal für 10 min mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Zur Detektion wurden gleiche Volumina der Detektionsreagenzien A und B (Westernblot-ECL-Detection-Kit, Amersham-Pharmacia) gemischt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in der Dunkelkammer ECL-Filme (Hyperfilm-ECL, Amersham-Pharmacia) für verschiedene Expositionszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.3.10 Anti-FLAG-ELISA

Mit Hilfe eines ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kann die Menge eines einzelnen Proteins in einem Proteingemisch (z.B. Zelllysate oder Zellkulturüberstand) mit Hilfe spezifischer Antikörper ohne weitere vorangehende Reinigungsschritte quantitativ bestimmt werden. Dazu wird entweder ein für das Protein spezifischer Antikörper auf einer speziell präparierten Oberfläche immobilisiert, mit Proteingemisch inkubiert und durch einen weiteren spezifischen Antikörper das gesuchte Protein markiert. Oder die Proteinmischung selbst wird immobilisiert, mit einem spezifischem Primärantikörper inkubiert und dann mit Sekundärantikörper überschichtet. Die Detektion erfolgt in beiden Fällen auf dieselbe Weise: durch den Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper wird das Substrat 3, 3', 5, 5', Tetramethylbenzidin umgesetzt, je nach Menge des gebundenen Antikörpers ändert sich dadurch die Absorption unterschiedlich stark. Eine absolute Quantifizierung kann vorgenommen werden, indem mit gereinigtem Zielprotein eine Verdünnungsreihe als Standard mitbestimmt wird. Steht kein gereinigtes Protein zur Verfügung, kann über den Vergleich unterschiedlicher Proben eine relative Quantifizierung erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Flag-getaggtter iPLA₂-Konstrukte relativ bestimmt.

Material

Blockierungspuffer	1x PBS, pH 7,4 0,5% (v/v) Tween20 1 % (w/v) BSA
10x Carbonat/Bicarbonat-Puffer	500 mM Natriumcarbonat/Bicarbonat, pH 9,6
Maus-anti-FLAG-Antikörper (Sigma)	Stocklösung 5 mg/mL Finalkonzentration 2 µg/mL
Stopplösung	0,2 M H ₂ SO ₄ in H ₂ O bidest.
Substratlösung (BioRad)	3, 3', 5, 5', Tetramethylbenzidin-Lösung
Waschpuffer	1x PBS, pH 7,4 0,5 % (v/v) Tween20
96-well Flachboden Mikrotiterplatte, Maxisorb (Nalgene Nunc International)	
Ziege-anti-Maus-IgG-HRP, EIA-Grade (BioRad)	1:5000 in Blockierungspuffer

Durchführung

Zelllysate von 2×10^6 Zellen wurden wie unter 2.3.11 angegeben hergestellt und die Proteinkonzentration auf $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe der Proben von $4 - 0,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in 1x Carbonat/Bicarbonat-Puffer hergestellt. Pro Vertiefung wurde $250 \mu\text{L}$ Probe in die Platte gegeben und für 16 h bei 4°C immobilisiert (entspricht $1 - 0,125 \mu\text{g}$ Protein pro Kavität). Die Näpfe wurden 5mal gewaschen und danach für 1 h bei 37°C mit je $250 \mu\text{L}$ Blockierungspuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde $100 \mu\text{L}$ Primärantikörper ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$ in Blockierungspuffer) zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert, danach die Vertiefungen gewaschen und mit je $100 \mu\text{L}$ Sekundärantikörper-Lösung überschichtet. Nach Abspülen der überschüssigen Antikörperlösung wurden $100 \mu\text{L}$ Substratlösung zugegeben und für einige Minuten im Dunkeln inkubiert, bis eine deutliche Farbreaktion sichtbar wurde. Diese wurde mit $100 \mu\text{L}$ Stopplösung abgestoppt und im Micro Tek FLI-Fluorometer (Bio-Tek Kontron Instruments) bei 405 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) die Absorption gemessen. Durch den Vergleich unterschiedlicher Proben wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen.

2.3.11 *In vitro*-Phospholipase A₂-Aktivitätstest

Zur Messung der hydrolytischen Aktivität verschiedener Formen der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ in Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit neben der unter 2.2.7 beschriebenen Messung eine weitere Methode angewendet. Dazu wurde ein cPLA₂ Assay Kit (Cayman Chemical) so modifiziert, dass ausschließlich die Messung der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂-Aktivität möglich war. Durch die Hydrolyse des PLA₂-Substrats Arachidonoyl-Thio-Phosphatidylcholin entsteht eine freie Thiol-Gruppe, die mit dem zugesetzten DTNB-Farbreakenz (5,5'-dithiobis(2-dinitrobenzoic acid)) unter Freisetzung von 5-Thio-2-Nitrobenzoylsäure reagiert. Durch die Änderung der Absorption bei 405 nm kann damit in Zelllysaten die PLA₂-Aktivität bestimmt werden.

Material

cPLA ₂ Assay Kit (Cayman Chemical)	Bromenol Lacton Lösung: 1 mM in DMSO DTNB/EGTA (5, 5'-dithiobis(2-dinitrobenzoic acid)= Ellman's Reagenz): 25 mM DTNB, 475 mM EGTA in 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 Substratlösung: 1,5 mM Arachidonyl-thio-Phosphatidylcholin in 1x Probenpuffer 96-well-Probenplatte
Lysepuffer	50 mM HEPES, pH 7,4 1 mM EGTA
2x Probenpuffer	160 mM HEPES, pH 7,4 300 mM Natriumchlorid 4 mM EDTA 8 mM Triton X-100 60 % Glycerin 2 mg/mL BSA

Durchführung

Jeweils 2×10^6 MCF7_{casp3} Zellen, wie unter 2.2.3 beschrieben für 30 h mit verschiedenen FLAG-iPLA₂-Konstrukten transfiziert, wurden in 100 µL hypotonem Lysepuffer für 10 min auf Eis lysiert und die Zelldebris durch Zentrifugation sedimentiert. Die Proben wurden mit 1x Probenpuffer auf eine Konzentration von 2 µg/µL eingestellt und je Kavität einer 96-well-Probenplatte 10 µL Probe pipettiert. Die Proben wurden mit 5 µL BEL-Lösung (Finalkonzentration 24 µM) oder 5 µL DMSO gemischt und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µL Substratlösung zugegeben, die Proben vorsichtig gemischt und 60 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 10 µL DTNB/EGTA-Lösung wurde für weitere 5 min inkubiert und anschließend im Micro Tek FLI-Fluorometer (Bio-Tek Kontron Instruments) bei 405 nm die Absorption gemessen. Zur Berechnung der Phospholipase A₂-Aktivität wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Absorption}_{405\text{nm}} / \text{min} = \frac{\text{Absorption}_{405\text{nm}} (\text{Probe}) - \text{Absorption}_{405\text{nm}} (\text{Kontrolle})}{60 \text{ min}}$$

$$\text{PLA}_2\text{-Aktivität} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = \frac{A_{405\text{nm}} / \text{min}}{10,66 \text{ mM}^{-1}} \times \frac{0,225 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \times \text{evtl. Verdünnungsfaktor}$$

Die spezifische Aktivität der Calcium-unabhängigen PLA₂ wurde berechnet, indem die Basalaktivität der mit Inhibitor vorbehandelten Proben von der Gesamtaktivität abgezogen wurde. Zur Berücksichtigung der unterschiedlich starken Expression der verschiedenen FLAG-iPLA₂-Formen wurde zusätzlich deren relative Expression (siehe 2.3.10) als Multiplikationsfaktor miteinbezogen.

2.3.12 Nachweis von Lysophosphatidylcholin

Zum Nachweis von Lysophosphatidylcholin (LPC) in den Überständen apoptotischer Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit ein enzymatisch gekoppelter Test mit vorausgehender Lipidextraktion nach Bligh-Dyer verwendet (Bligh und Dyer, 1959). Dabei wird LPC in mehreren Schritten enzymatisch

abgebaut, wobei H_2O_2 freigesetzt wird (modifiziert nach Kishimoto et al., 2002). Dadurch kann Peroxidase-katalysiert der Farbstoff Amplex Ultra Red umgesetzt und dessen Fluoreszenz detektiert werden.

Material

Amplex Ultra Red (Molecular Probes Invitrogen)	40 mM in DMSO Finalkonzentration 20 μM
Bovines Serumalbumin (BSA), fettsäurefrei (Sigma)	Stocklösung 10 % in PBS Finalkonzentration 0,5 %
Chloroform (Merck)	
Glycerol-3-Phosphat-Oxidase (Sigma)	200 U/mL in H_2O Finalkonzentration 1 U/mL
GPC-Phosphodiesterase (Sigma)	20 U/mL in H_2O Finalkonzentration 0,1 U/mL
Lysophospholipase A1	Rekombinante humane LPL-A1 (siehe 2.1.4) 4 mg/mL in TBS 10 % Glycerin Finalkonzentration 20 $\mu\text{g/mL}$
Lysophosphatidylcholin (Avanti Polar Lipids)	1 mg (1,91 μmol) in Chloroform Standardreihe 0, 250, 500, 750 und 1000 pmol
Methanol (Merck)	
Natriumchlorid	1 M NaCl
Peroxidase (Sigma)	200 U/mL in H_2O Finalkonzentration 1 U/mL
10x Puffer A	1 M Tris-Hydrochlorid pH 8,0 0,1 % Triton X-100 10 mM Calciumchlorid
10x Puffer B	1 M Tris-Hydrochlorid pH 8,0 0,1 % Triton X-100

Durchführung

Wie unter 2.2.4 beschrieben wurden die Überstände von je 2×10^6 vitalen oder apoptotischen MCF7_{casp3} Zellen gewonnen, jedoch in 1 mL Volumen. Zur Lipidextraktion wurden die Überstände in Reagenzgläser (160x16 mm) überführt und 0,5 % fettsäurefreies BSA zugegeben. Dann wurden die Proben mit je 3,75 mL Methanol/Chloroform (4:1) versetzt, mit einem Papierstopfen verschlossen und für 10 - 15 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 1,25 mL Chloroform zugegeben, für 1 min gemixt, dann 1,25 mL 1 M Natriumchloridlösung zugegeben und eine weitere Minute unter Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation für 20 min bei 2000g und 4°C wurden die Proben in die einzelnen Phasen separiert. Die untere organische Phase wurde mit Hilfe einer Glaspasteurpipette abgenommen, in ein frisches Reagenzglas überführt und unter einem Stickstoffstrom das Lösungsmittel abgedampft. Der trockene Lipidniederschlag wurde 1x mit 200 μL Methanol gewaschen und nochmals unter Stickstoff getrocknet.

Zur LPC-Messung wurden die getrockneten Lipide aus den Überständen von 4×10^6 Zellen in 250 μL 1x Puffer A mit Zusatz von 20 μM Amplex Ultra Red, 0,1 U/mL GPC-Phosphodiesterase, 1 U/mL Glycerol-3-Phosphat-Oxidase und 1 U/mL Peroxidase aufgenommen und in eine 96-well-Reaktionsplatte überführt. Dann wurde für 10 min im Micro Tek FLI-Fluorometer (Bio-Tek Kontron

Instruments) bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm bei 37°C die Basalreaktion gemessen, um möglicherweise bereits in den Proben enthaltene Abbauprodukte von LPC abreagieren zu lassen. Die LPC-Messung wurde dann durch Zugabe von 75 µL 1x Puffer B mit 20 µg/mL Lysophospholipase A1 gestartet und die Fluoreszenz über 45 min gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit gereinigtem LPC mitbestimmt, die ebenso wie die Proben einer vorherigen Extraktion unterzogen wurde. Mittels der geräteeigenen Software (KC4) wurde nach Abzug der basalen Fluoreszenz die Zunahme der Fluoreszenz pro Minute ermittelt und die in den Proben enthaltene Menge an LPC mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

2.3.13 Nachweis von Lipid-Hydroperoxiden

Neben der Messung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (siehe 2.2.8) kann zur Untersuchung oxidativer Vorgänge, z.B. des während der Apoptose auftretenden oxidativen Stresses, auch die Menge an Lipid-Hydroperoxiden bestimmt werden. Diese entstehen durch die Einwirkung von ROS auf ungesättigte Fettsäuren, die Bestandteil vieler Membranlipide und Phospholipide sind. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung von oxidierten Lipiden ein spezieller Kit zum Nachweis von Lipid-Hydroperoxiden (LPO) verwendet (Lipid Peroxidation Assay Kit II, Calbiochem). Dabei wird zweiwertiges Eisen direkt durch Lipid-Hydroperoxide oxidiert, das dann mit dem Indikator-Farbstoff Xylenol Orange zu einem stabilen, farbigen Komplex reagiert, der colorimetrisch nachgewiesen werden kann.

Material

Lipid Peroxidation Assay Kit II (Calbiochem)	Catalase (2 mL in PBS) Farbentwickler ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ in H_2SO_4) Farbreagenz (Xylenol Orange, in Methanol mit butyliertem Hydroxytoluol) PBS, pH 7,0 Reduktionsagens (Tris(2-carboxyethyl)phosphine HCl (TCEP) in deionisiertem H_2O)
1x PBS (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Serumfreies Medium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben, FCS-frei
Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben

Durchführung

Zur Messung von Lipid-Hydroperoxiden wurden die Zellen nach α -Tocopherol-Vorbehandlung wie unter 2.2.4 beschrieben behandelt und 6 h nach Apoptose-Induktion geerntet. Die Pellets von 2×10^6 Zellen wurden in 250 µL 4 mM butyliertem Hydroxytoluol in 10 mM Tris-HCl pH 7,6 resuspendiert und bei Bedarf bei -70°C zwischengelagert. Danach wurden die Proben in den Dounce-Homogenisator (Spaltbreite 70 µm) überführt und mit 30 Stößen auf Eis homogenisiert. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation abgetrennt und 90 µL des Zellysats mit 10 µL Catalase-Lösung in einem 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, um H_2O_2 abzubauen. Die Proben wurden dann mit 10 µL H_2O versetzt, zu den Leerwertproben 10 µL Reduktionsagens

(TCEP) gegeben, um die enthaltenen oxidierten Lipide zu reduzieren, und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 900 µL Färbelösung (Farbentwickler/Farbreagenz 1:100) 30 Sekunden lang gemixt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (10.000 g, 10 min) und 900 µL der Proben in eine Küvette transferiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 560 nm gegen Wasser in einem Einkanal-UV-VIS-Spektrometer (Beckmann DU-640). Die Absorption der Leerwertprobe wurde von der Absorption der jeweiligen Probe abgezogen und die Konzentration an Lipid-Hydroperoxiden berechnet (siehe Angaben LPO assay kit II).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion aus eukaryontischen Zellen

Die theoretische Grundlage dieser Methode ist eine Homogenisierung der Zellen mit Hilfe einer Guanidinisothiocyanat-Denaturierungslösung, durch die Proteine sehr effektiv denaturiert und im Probenmaterial enthaltene RNasen inaktiviert werden, gekoppelt mit einer Anionenaustauschchromatographie. Dabei wird in den Lysaten enthaltene DNA durch DNase-Verdau entfernt. Abschließend wird die RNA unter Niedrigsalzbedingungen von der Säule eluiert. Zur RNA-Extraktion wurde in der vorliegenden Arbeit das NucleoSpin RNA II-Kit von Macherey und Nagel verwendet.

Beim Arbeiten mit RNA ist besondere Sorgfalt erforderlich, da diese chemisch relativ instabil ist und sehr rasch durch im Probenmaterial enthaltene bzw. in Reagenzien oder der Umgebung befindliche RNasen abgebaut wird. Deshalb wurde das Probenmaterial unmittelbar nach der entsprechenden Vorbehandlung trocken bei -70°C gelagert und möglichst innerhalb weniger Tage die RNA-Isolierung durchgeführt. Für das Ansetzen der Lösungen wurde DEPC-behandeltes H_2O bidest. verwendet. Es wurde immer mit Einweghandschuhen unter Verwendung von RNase-freien Filter-Pipettenspitzen (Safe Seal-Tops (Biozym)) gearbeitet.

Material („NucleoSpin RNA II“)

DNase I (Macherey&Nagel)	1 Aliquot aufgelöst im angegebenen Volumen RNase-freiem Wasser
DNase Reaktionspuffer (Macherey&Nagel)	
Ethanol (Merck)	70%ig 96 - 100%ig
H_2O , RNase-frei (Macherey&Nagel)	
Lysepuffer RA1 (Macherey&Nagel)	350 µL Lysepuffer RA1 1 % β -Mercaptoethanol
Membran-Entsalzungspuffer, MDB (Macherey&Nagel)	
NucleoSpin Sammelgefäße (Macherey&Nagel)	
NucleoSpin Filter Säulen (Macherey&Nagel)	
NucleoSpin RNA II Säulen (Macherey&Nagel)	
Waschpuffer RA2 (Macherey&Nagel)	

Waschpuffer RA3 (Macherey&Nagel)	Konzentrierter Waschpuffer RA3 wurde mit der angegebenen Menge 96 - 100 %igem Ethanol verdünnt
----------------------------------	--

Durchführung

Das bei -70°C gelagerte Pellet von $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurde in $350 \mu\text{L}$ Lysepuffer RA1 + 1 % β -Mercaptoethanol resuspendiert, wodurch neben der Zellyse auch eine Inaktivierung der enthaltenen RNasen erfolgte und die weiteren Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnten. Danach wurde das Lysat über eine Filtersäule von nicht-lysierten Bestandteilen getrennt, $350 \mu\text{L}$ 70%iger Ethanol zugegeben und das so vorbereitete Lysat zur Adsorption der RNA auf die Silikasäule gegeben. Durch Zentrifugation wurde das restliche Lysat entfernt und die Silikamembran 1x mit $350 \mu\text{L}$ Entsalzungspuffer gewaschen. Um ebenfalls an die Membran gebundene DNA zu entfernen wurden $90 \mu\text{L}$ DNase-Reaktionspuffer mit $10 \mu\text{L}$ DNase-Lösung gemischt, auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule zuerst mit $200 \mu\text{L}$ Waschpuffer RA2 und dann 2x mit Waschpuffer RA3 gewaschen ($600 \mu\text{L}$ bzw. $250 \mu\text{L}$). Durch Zentrifugation wurde die Säule getrocknet und die gebundene RNA mit $60 \mu\text{L}$ RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der so erhaltenen RNA-Lösung wurde spektrometrisch bestimmt und die Lösung bis auf weiteres bei -70° gelagert.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Die Grundlage hierfür ist das Absorptionsspektrum von DNA und RNA im UV-Bereich. Gemessen werden die Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. Der Absorptionswert bei 260 nm dient der Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Ein Extinktionswert von 1 entspricht einer Doppelstrang-DNA-Lösung von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ oder einer Einzelstrang-RNA-Lösung von $40 \mu\text{g}/\text{mL}$. Der Absorptionswert bei 280 nm ermöglicht eine Reinheitsbewertung der DNA-Lösung, da hier Verunreinigungen mit Phenol oder mit Proteinen bestimmt werden können. Für eine reine DNA-Lösung hat das Absorptionsverhältnis $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$ den Wert 2. Sind aber zusätzlich Phenol oder Proteine in dieser Lösung vorhanden, steigt die Absorption bei 280 nm, und das Verhältnis $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$ wird kleiner als 2. Eine akzeptable DNA- bzw. RNA-Präparation besitzt ein Verhältnis $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$ von 1,6 - 2.

Durchführung

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe eines programmierbaren Einkanal-UV-VIS-Spektrometer (Beckmann DU-640) in einer Vierfach-Mikroküvette aus Quarzglas (Beckmann Instruments) durchgeführt. Nach Leerwertmessung und Küvettenabgleich wurden die Absorptionswerte einer 1:100 Verdünnung der Testlösung in H_2O bidest. in einem finalen Volumen von $200 \mu\text{L}$ bestimmt. Das Gerät berechnete daraus die entsprechende Nukleinsäurekonzentration und das Absorptionsverhältnis automatisch.

2.4.3 Reverse Transkription

Reverse Transkriptasen sind multifunktionelle Enzyme mit der Kernaktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die aus Retroviren (z.B. aus dem Avianen Myeloblastosis Virus, AMV) isoliert

wurden. Ihre RNA-abhängige 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität macht man sich zunutze, um ausgehend von Oligonukleotid-Primern (Random-Hexameren oder Oligo-dT) zelluläre mRNA für die anschließende Klonierung oder PCR in komplementäre DNA (cDNA) zu überführen.

Material

SuperScript™ II RNase H ⁻ (Invitrogen Life Technologies)	200 U/μl
5x Reaktionspuffer (Invitrogen Life Technologies)	250 mM Tris-Hydrochlorid pH 8,3 375 mM Kaliumchlorid 15 mM Magnesiumchlorid
0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen Life Technologies)	
Pd(N) ₆ Random Hexamere (Amersham)	0,2 μg/μL
RNasin™ (Promega)	40 U/μl, Rekombinanter RNase-Inhibitor
10 mM dNTP	Je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (alle Promega)
H ₂ O bidest. DEPC-behandelt (Roth)	

Durchführung

Tabelle 2.5: Zusammensetzung einer Standard-RT-Reaktion.

	Denaturierungsansatz (12 μl)	Reverse Transkription (20 μl)
RNA	1 μg	
Random Hexamer	2 μL (0,2 μg/μL)	
dNTP	1 μL (10 mM)	
H ₂ O	auf 12 μL Volumen auffüllen	
RNasin™		1 μL (40 U/μL)
5x Reaktionspuffer		4 μL (1x)
DTT		2 μL (100 mM)
SuperScript™ II RNase H ⁻		1 μL (200 U/μL)

Reverse Transkriptionsreaktionen wurden ausgehend von 1 μg Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 μl durchgeführt. 1 μg RNA wurden zunächst mit 400 ng Random Hexamer und 1 μL 10 mM dNTP's in einem Volumen von 12 μl auf Eis versetzt und für 5 min bei 65°C denaturiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Die Lösung wurde auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 μl 5x Reaktionspuffer, 2 μL 100 mM DTT und 40 U RNasin zugegeben und bei 42°C für 2 min inkubiert, um eine Bindung der Random Hexamer-Primer an die RNA zu ermöglichen. Nach Abkühlen und der Zugabe von 200 U SuperScript™ II RNase H⁻ wurden die Proben zunächst für 10 min bei 25°C inkubiert, dann für 50 min bei 42°C die DNA-Polymerisation ermöglicht und abschließend die Reverse Transkriptase durch 15-minütige Inkubation bei 72°C inaktiviert. Alle Inkubationsschritte wurden im Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.4.4 Real-Time PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, abgekürzt PCR (*polymerase chain reaction*), ist eine Methode zur exponentiellen, selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR ist die dreiphasige

enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind.

Die PCR besteht aus drei Hauptschritten, die in ca. 35 Zyklen wiederholt werden:

- Denaturierungsphase: die doppelsträngige Ausgangs-DNA wird durch Erhitzen auf 95°C in die beiden Einzelstränge zerlegt
- *Annealing*-Phase: Anlagern der beiden Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen der jetzt einzelsträngigen Ausgangs-DNA bei 50 - 60°C
- Elongations-Phase: DNA-Polymerase-katalysierte DNA-Synthese bei 68 - 72°C

Die Zunahme der Synthese-Produkte folgt einer exponentiellen Kinetik, die aufgrund von Substratmangel, Enzymmangel und hemmenden Nebenprodukten ein Sättigungsverhalten zeigt. Der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase, die bei den hohen Reaktionstemperaturen nicht denaturiert und demnach nicht vor jedem Reaktionszyklus neu zugegeben werden muss, ermöglicht eine leichte Automatisierung der PCR-Methode.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zu analytischen Zwecken eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Menge an PCR-Produkt für jeden Zyklus während der gesamten PCR-Reaktion aufgezeichnet und eine relative oder absolute Quantifizierung vorgenommen werden kann. Die Grundlage dafür ist die während der Reaktion gemessene Fluoreszenz, deren Zunahme proportional zur Menge an amplifizierter DNA ist. Hierfür existieren verschiedene Detektionsmethoden; in der vorliegenden Arbeit wurde sowohl mit SYBR[®] Green-Farbstoff als auch mit einem TaqMan[®]-*probe*-basierten System gearbeitet. Bei der SYBR[®] Green-Methode interkaliert der zugegebene SYBR[®] Green-Farbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA, wobei der Farbstoff nur in gebundenem Zustand ein Signal emittiert. Bei der TaqMan[®]-*probe*-Methode wird zusätzlich zu den PCR-Primern ein mit zwei Farbstoffen markiertes Oligonukleotid zur Reaktion gegeben, das spezifisch an den amplifizierten DNA-Abschnitt bindet. Während der DNA-Synthese wird dieses Oligonukleotid durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten und damit die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs ermöglicht.

Material

qPCR [™] Mastermix Plus for SYBR [®] Green I (Eurogentec)	SYBR [®] Green I dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) HotGoldStar DNA-Polymerase Uracil-N-Glycosylase Magnesiumchlorid (Finalkonzentration 5 mM) Passiver Referenzfarbstoff ROX Stabilisatoren (keine näheren Angaben)
qPCR [™] Mastermix Plus (Eurogentec)	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) HotGoldStar DNA-Polymerase Uracil-N-Glycosylase Magnesiumchlorid (Finalkonzentration 5 mM) Passiver Referenzfarbstoff ROX Stabilisatoren (keine näheren Angaben)
Primer (MWG Biotech)	Stocklösungen 2 µM Finalkonzentration 200 - 300 nM

Probe (MWG Biotech)	Stocklösung 2 μ M Finalkonzentration 100 nM
H ₂ O, DEPC-behandelt (Roth)	
Filter-Pipettenspitzen (Biozym)	
Dünnwandige 0,2mL-Reaktionsgefäße (Biozym)	
96-well-PCR-Reaktionsplatten (Greiner Bio One)	
Abdeckfolie, Ampliseal (Greiner Bio One)	
<i>Real-time</i> PCR-Gerät (Applied Biosystems)	ABI PRISM [®] SDS 7000

Tabelle 2.5 zeigt die in der Regel eingesetzten Reaktionsparameter eines *real-time*-qPCR-Ansatzes (20 μ l Reaktionsvolumen).

Tabelle 2.6: Zusammensetzung einer Standard-*real-time* qPCR-Reaktion.

	SYBR [®] Green-PCR	TaqMan [®] - <i>probe</i> -PCR
2x qPCR [™] Mastermix Plus for SYBR [®] Green I	10 μ L	-
2x qPCR [™] Mastermix Plus	-	10 μ L
Primer	Je 3 μ L <i>sense</i> und <i>antisense</i> Primer, Finalkonzentration 300 nM	Je 2 μ L <i>sense</i> und <i>antisense</i> Primer, Finalkonzentration 200 nM
Probe	-	1 μ L, Finalkonzentration 100 nM
H ₂ O	2 μ L	3 μ L
cDNA	2 μ L (10 - 40 ng/ μ L)	2 μ L (10 - 40 ng/ μ L)

Durchführung

Für die quantitative *real-time* PCR wurden, wie in Tabelle 2.5 angegeben, Mastermix, Primer, evtl. Probe und Wasser auf Eis gemischt. In die 96-well-Reaktionsplatte wurden jeweils 2 μ L cDNA (siehe 2.4.3) (20 - 80 ng pro Reaktion) vorgelegt und mit 18 μ L des vorbereiteten Mixes auf 20 μ L Reaktionsvolumen aufgefüllt. Eine Probe ohne DNA diente als Negativkontrolle. Die Platte wurde mit einer speziellen Abdeckfolie (Ampliseal, Greiner Bio One) verschlossen, in das *real-time* PCR-Gerät (ABI PRISM[®] 7000) gestellt und die Reaktion gestartet. Vor der eigentlichen PCR-Reaktion wurden die Proben für 2 min bei 50°C inkubiert, um mögliche Verunreinigungen der Proben mit anderen PCR-Produkten durch die Aktivität der Uracil-N-Glykosylase zu beseitigen. Dann wurde zur Aktivierung der HotGoldStar DNA-Polymerase (modifizierte *Taq*-Polymerase) und Inaktivierung der Uracil-N-Glykosylase für 10 min auf 95°C erhitzt. Danach folgten 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C und 1 min bei 60°C, wobei die *Annealing*- und Elongationsphase in einem Inkubationsschritt zusammengefasst wurden. Zur Auswertung wurde die geräteeigene Software (ABI Prism 7000 SDS Software) genutzt. Die Expression des Zielgens wurde mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode auf die Expression eines stabilen Referenzgens normalisiert. Die relative Quantifizierung erfolgte in der Regel durch den Vergleich unterschiedlich behandelter Proben untereinander oder über eine Standardkurve. Bei einem Vergleich der Expression unterschiedlicher Zielgene wurde die relative Quantifizierung unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz der jeweiligen PCR-Reaktion vorgenommen.

2.4.5 Plasmid-DNA Isolierung

Die Plasmid-DNA Isolierung wurde nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse gekoppelt an eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die theoretischen Grundlagen dieser Extraktionsmethode sind eine alkalische Zellyse (Birnboim und Doly, 1979) mit anschließender SDS-Hochsalzfällung der genomischen DNA und Bindung der Plasmid-DNA an eine Glasfasermatrix in Gegenwart von Guanidiniumchlorid. Die Plasmid-Glasfaser-Aggregate werden im Folgenden gewaschen, und abschließend eluiert man die Plasmid-DNA in wässriger Lösung unter Niedrigsalzbedingungen. Diese Extraktionsmethode zeichnet sich durch einfache, schnelle Handhabung und große Reinheit der isolierten Plasmid-DNA aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden die unter 2.1.3 beschriebenen Plasmidkonstrukte im Maxi-Maßstab aus Bakterienkulturen isoliert, um sie zur Transfektion und transienten Überexpression in eukaryontischen Zellen zu nutzen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des "Nucleobond AX 500" Kits (Macherey und Nagel).

Material ("Nucleo Bond AX 500" Kit)

LB-Medium	10 g/l Bacto Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid pH 7,0 60 µg/mL Kanamycin
2000x Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin in H ₂ O bidest.
Resuspendierungspuffer S1 (Macherey und Nagel)	50 mM Tris-Hydrogenchlorid 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A pH 8,0
Lysepuffer S2 (Macherey und Nagel)	200 mM Natriumhydroxid 1% (w/v) SDS
Neutralisationspuffer S3 (Macherey und Nagel)	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
Äquilibrierungspuffer N2 (Macherey und Nagel)	100 mM Tris-Hydrogenphosphat 15% (v/v) Ethanol 900 mM Kaliumchlorid 0,15% (v/v) Triton X-100 pH 6,3
Waschpuffer N3 (Macherey und Nagel)	100 mM Tris-Hydrogenphosphat 15% (v/v) Ethanol 1150 mM Kaliumchlorid pH 6,3
Elutionspuffer N5 (Macherey und Nagel)	100 mM Tris-Hydrogenphosphat 15% (v/v) Ethanol 1000 mM Kaliumchlorid pH 8,5
Faltenfilter (Macherey und Nagel)	
Anionenaustauschersäule AX 500 (Macherey und Nagel)	
100% Isopropanol	
70% (v/v) Ethanol	

Durchführung

Zunächst wurde eine Bakterienvorkultur (5 mL) in LB-Antibiotikum-Medium angelegt und für 8 h im Schüttelinkubator bei 37°C kultiviert. Die Vorkultur wurde anschließend in 150 mL LB-Antibiotikum-Medium überführt und über Nacht (12 - 16 h) im Bakterienschüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden sedimentiert und mit 12 mL Resuspendierungspuffer S1 in ein Corex-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Es wurden 12 mL Lysepuffer S2 zugegeben, durch Invertieren vorsichtig gemischt und der Denaturierungsansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 12 mL eisgekühltem Neutralisationspuffer S3 wurde wiederum vorsichtig gemischt und der Fällungsansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierte, genomische DNA wurde durch Filtration durch einen Faltenfilter abgetrennt und der Plasmid-haltige Überstand bis zur Anionenaustauschchromatographie auf Eis gelagert. Die Anionenaustauschersäule AX500 wurde mit 5 mL Äquilibriumspuffer N2 äquilibriert und das klare, Plasmid-haltige Bakterienlysat auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 12 mL Waschpuffer N3 gewaschen und die Plasmid-DNA mit 11 mL Elutionspuffer N5 eluiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 0,7 vol (hier 8 mL) 100% Isopropanol gefällt und sofort für 30 min bei 15.000 g sedimentiert. Das DNA-Sediment wurde mit 5 mL 70% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 15.000 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung des restlichen Ethanols wurde das DNA-Sediment getrocknet und abschließend in 200 - 500 µl H₂O bidest. aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.4.6 Anlage einer Bakterien Glycerin-Dauerkultur

Zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen wurden 2 mL LB-Antibiotikum-Medium mit einer Einzelkolonie der betreffenden Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 55% (v/v)) kann diese Kultur bei -70°C dauerhaft konserviert werden. Bei Bedarf wurden zur Anzucht 2 mL LB-Antibiotikum-Medium mit 10 µl der Glycerin-Dauerkultur inokuliert und bei 37°C im Bakterienschüttler kultiviert.

3 Ergebnisse

3.1 Prozessierung und Aktivierung der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂) während der Apoptose

3.1.1 iPLA₂ wird während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert

Die Freisetzung löslicher Attraktionssignale während der Apoptose spielt in höheren Organismen eine wichtige Rolle, um die effiziente Eliminierung apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten zu ermöglichen. Als ein wichtiger chemotaktisch aktiver Lockstoff konnte das Phospholipid Lysophosphatidylcholin identifiziert werden (Lauber et al., 2003), das durch die Calcium-unabhängige Phospholipase-A₂ (iPLA₂)-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylcholin entsteht. Dabei wurde beobachtet, dass iPLA₂ während der Apoptose Caspase-3-abhängig prozessiert und dadurch vermutlich aktiviert wird. Da jedoch die Expression der prozessierten Form von iPLA₂ alleine nicht ausreicht, um in vitalen Zellen das Attraktionssignal freizusetzen, sollte untersucht werden, ob die Prozessierung von iPLA₂ mit einer Aktivierung einhergeht.

Hinsichtlich dieser Fragestellung sollte zunächst das genaue Prozessierungsmuster von iPLA₂ und die Caspase-3-Abhängigkeit sowohl im Zellkultursystem als auch *in vitro* (mit Hilfe von gereinigter iPLA₂ und gereinigter Caspase-3) näher betrachtet werden. Dazu wurden die in Abbildung 3.1A schematisch dargestellten, an potentiellen Caspase-Schnittstellen trunkierten, FLAG-getaggten iPLA₂-Konstrukte verwendet. Durch Entfernen der Ankyrin-Motive an der Schnittstelle DLFD⁵¹³ entsteht das 32 kDa große Fragment iPLA₂ aa514-806, durch eine weitere Trunkierung am C-Terminus (MVVD⁷³³) die 26-kDa-Form iPLA₂ aa514-733. Dieses Konstrukt wurde zusätzlich um das Aspartat⁷³³ gekürzt, wodurch iPLA₂ aa514-732 (26 kDa) entsteht. Die hier ebenfalls dargestellte iPLA₂-Form aa1-512 (Ankyrin-Motive ohne aktives Zentrum) entsteht durch Trunkierung vor dem aktiven Zentrum an DLFD⁵¹³ und wurde für spätere Versuche (siehe Abschnitt 3.2.2) verwendet. Die unterschiedlichen iPLA₂-Konstrukte wurden in Caspase-3-defizienten MCF7_{vektor} Zellen und in mit Caspase-3 retransfizierten MCF7_{casp3} Zellen transient überexprimiert, durch UV-Bestrahlung wurde Apoptose induziert und die iPLA₂-Prozessierung im Westernblot analysiert. Obwohl in beiden Zelllinien durch UV-Bestrahlung Apoptose ausgelöst werden kann (Lauber et al., 2003), konnte nur in den Caspase-3 positiven MCF7 Zellen eine Prozessierung von iPLA₂ beobachtet werden. Wie in Abbildung 3.1B gezeigt, wurde in den Caspase-3-defizienten Zellen zu keinem Zeitpunkt nach Apoptose-Induktion eine Prozessierung der iPLA₂ beobachtet. In MCF7_{casp3} Zellen dagegen wurde sowohl die 86-kDa-Volllängenform (aa1-806) als auch das N-terminal trunkierte 32-kDa-Konstrukt (aa514-806) in ein 26 kDa großes Fragment gespalten, das 8 - 10 Stunden nach UV-Bestrahlung nachweisbar war. Auch die 26-kDa-Form iPLA₂ aa514-733 mit C-terminalem FLAG-Tag wurde in MCF7_{casp3} Zellen weiter prozessiert, wobei dasselbe Spaltfragment wie bei iPLA₂ aa1-806 und aa514-806 entstand; iPLA₂ aa514-732 dagegen wurde nicht gespalten. Die Prozessierung von iPLA₂ aa514-733 lässt sich somit vermutlich durch die Abspaltung des C-terminal zur Prozessierungsstelle (MVVD⁷³³) gelegenen Flag-Tags erklären. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass diese Prozessierung nach Deletion von Asp⁷³³ im Fall des aa514-732-Konstrukts nicht mehr auftritt. Aus Abbildung 3.1B wird auch deutlich, dass die Spaltung

von iPLA₂ Caspase-3 abhängig verläuft, es kann jedoch nicht belegt werden, ob Caspase-3 oder vielleicht eine nachgeschaltete Protease iPLA₂prozessiert.

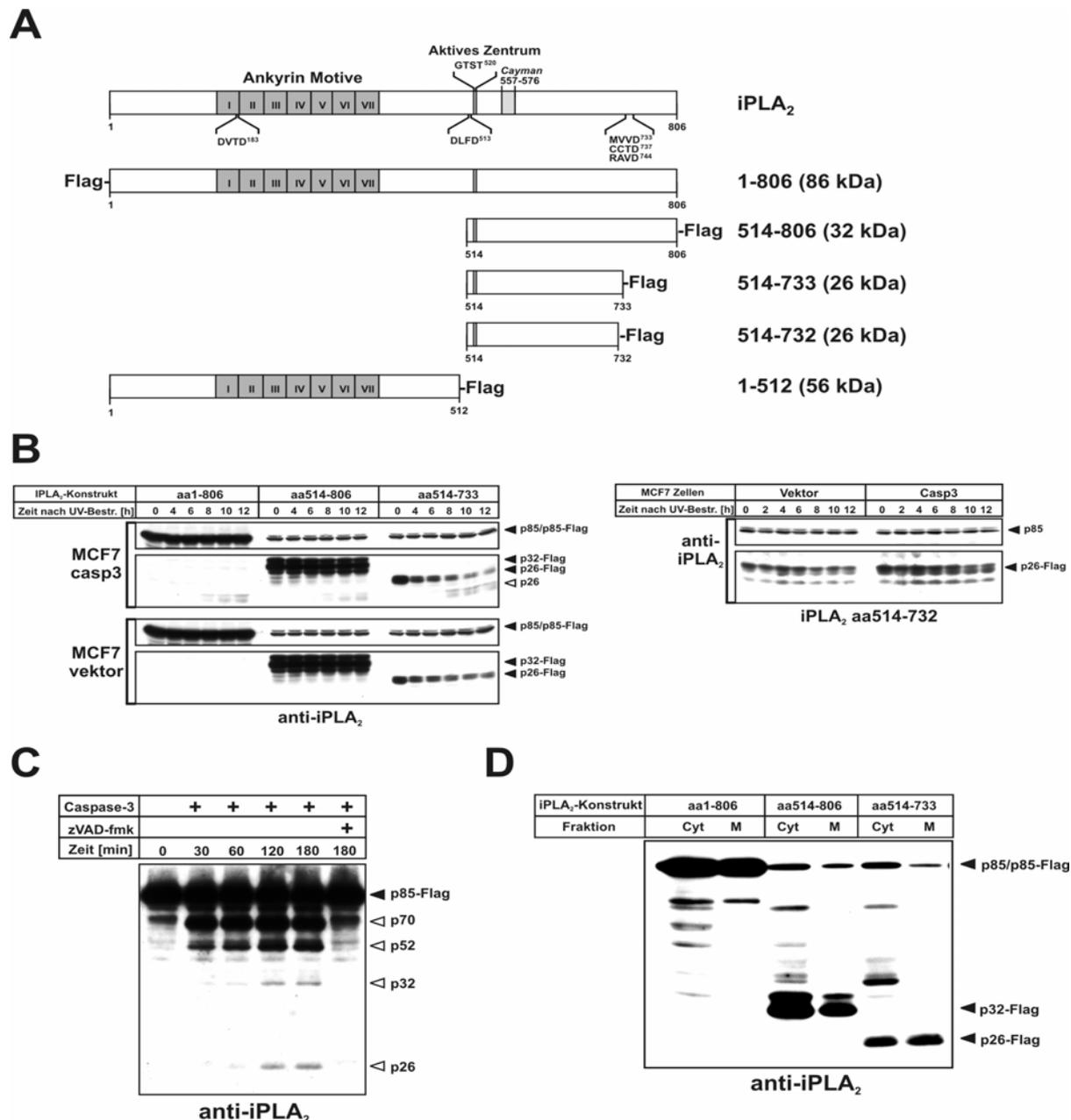


Abbildung 3.1: iPLA₂ wird während der Apoptose durch Caspase-3 in ein 26-kDa-Fragment gespalten (aa514-733).

(A) Schematische Darstellung der Struktur und der verwendeten Expressionskonstrukte der humanen iPLA₂. Aktives Zentrum, Caspase-Schnittstellen und die Position des Immunisierungspeptids des Westernblot-Antikörpers sind besonders gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (Laubert et al., 2003).

(B) Überexpression des Vollängen-Proteins und verschiedener trunktierter iPLA₂-Formen. MCF7_{casp3} und MCF7_{vektor} Zellen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben mit Hilfe des Lipofektionsagens FUGENETM6 mit der N-terminal FLAG-getaggten Vollängenform von iPLA₂ (aa1-806) bzw. mit den trunktierter C-terminal FLAG-getaggten iPLA₂-Konstrukten aa514-806, aa514-733 und aa514-732 transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Lysat von 3 x 10⁵ Zellen pro Probe in einem 8 - 15 %igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression und Prozessierung von iPLA₂ wurde im Westernblot mit dem anti-iPLA₂-Antikörper nachgewiesen.

(C) *in vitro*-Spaltung von gereinigter iPLA₂ durch gereinigte Caspase-3. Die über das FLAG-Tag aufgereinigte iPLA₂ von ca. 4 x 10⁷ Zellen (= 20 µL Eluat) (siehe 2.3.3) wurde für die angegebenen Zeiten mit 2 µg gereinigter humaner Caspase-3 in An- bzw. Abwesenheit der Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk (500 µM) inkubiert. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE

(8 - 15 %iges Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und die Prozessierung der iPLA₂ im Westernblot mittels des anti-iPLA₂-Antikörpers nachgewiesen.

(D) Intrazelluläre Lokalisation von iPLA₂. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit Hilfe von FuGENE™₆ mit der Volllängen-Form von iPLA₂ (aa1-806 N-FLAG) bzw. mit den trunkierten Formen aa514-806 und aa514-733 (beide C-FLAG) transfiziert, wie unter 2.2.3 beschrieben. 24 h nach Transfektion wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt (siehe 2.3.5) und die Cytosol- und Membranfraktion von je 0,5 x 10⁶ Zellen nach SDS-PAGE (8 - 15 %iges Gel) im Westernblot mit dem anti-iPLA₂-Antikörper analysiert.

Deshalb wurde, wie in Abbildung 3.1C dargestellt, die gereinigte Volllängen-FLAG-iPLA₂ mit gereinigter Caspase-3 *in vitro* inkubiert. Dabei ließ sich die in Zelllysaten nachgewiesene Prozessierung zu einem 26 kDa großen Spaltfragment bestätigen. Daraus kann geschlossen werden, dass das Fragment iPLA₂ aa514-733 das finale Produkt der Caspase-3-Prozessierung darstellt. Ebenso konnte damit gezeigt werden, dass iPLA₂ direkt durch Caspase-3 gespalten wird und nicht durch eine andere Caspase-3-abhängige Protease. Während des Abbaus entstanden weitere intermediäre Spaltprodukte von 70 kDa (beschrieben von Atsumi et al., 2000), 52 kDa und 32 kDa, deren Auftreten durch Caspase-3 bedingt war und durch Zugabe des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk blockiert werden konnte.

Atsumi et al. vermuteten, dass die Prozessierung der iPLA₂ zu einer veränderten Affinität des Enzyms zu intrazellulären Membranen, und damit zum Substrat Phosphatidylcholin, führen könnte (Atsumi et al., 2000). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation der iPLA₂ nach deren Überexpression untersucht. Dabei konnte, wie in Abbildung 3.1D dargestellt, für die drei verwendeten Konstrukte (iPLA₂ aa1-806, aa514-806 und aa514-733) in vitalen Zellen eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen Cytosol (Cyt) und Membranfraktion (M) nachgewiesen werden.

3.1.2 Prozessierte iPLA₂ hat eine höhere Aktivität als das Volllängen-Protein

Im Verlauf der Apoptose werden zahlreiche Proteine durch Caspasen gespalten und dadurch entweder aktiviert oder inaktiviert. Für iPLA₂ konnte bereits gezeigt werden, dass nach Überexpression der trunkierten 26-kDa-Form (aa514-733) mehr chemotaktisches Potential in den Überständen apoptotischer Zellen vorhanden ist als nach Expression des Volllängenproteins (Lauber et al., 2003). Außerdem konnten Atsumi et al. zeigen, dass nach Überexpression eines 70-kDa-Fragments der iPLA₂ (aa184-806) mehr Arachidonsäure freigesetzt wird im Vergleich zur Volllängenform (Atsumi et al., 2000). Ob jedoch neben der Prozessierung weitere Mechanismen zur Aktivierung der iPLA₂ und zur anschließenden Freisetzung des Attraktionssignals LPC beitragen, war bislang ungeklärt. Deshalb sollte zuerst untersucht werden, ob die beobachtete Prozessierung der iPLA₂ alleine für deren Aktivierung verantwortlich und ausreichend ist.

Dazu wurde die iPLA₂-Aktivität sowohl im Zellsystem als auch in Zelllysaten (*in vitro*) in nicht-apoptotischen Zellen bestimmt. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit den iPLA₂-Konstrukten aa1-806 (86 kDa), aa514-806 (32 kDa) und aa514-733 (26 kDa) oder dem Leervektor transfiziert. Zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen mit dem fluorogenen PLA₂-Substrat Bis-BODIPY®FL C₁₁-PC (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine) (BBPC) beladen und anschließend die Zunahme der grünen Fluoreszenz über 90 min analysiert. Bei einer Spaltung von BBPC durch Phospholipase A₂ kam es zu einem deutlichen Anstieg der grünen Fluoreszenz der Zellen. In Abbildung 3.2A ist die Aktivität der mit

den verschiedenen iPLA₂-Formen transfizierten Zellen als Zunahme des Fluoreszenzmittelwertes pro min dargestellt, wobei die trunkierte 26-kDa-Form (aa514-733) eine deutlich höhere Aktivität aufwies als die Volllängenform (aa1-806) oder die 32-kDa-iPLA₂ (aa514-806). Gegenüber der Vektorkontrolle führte die Überexpression aller drei iPLA₂-Formen zu einer höheren Aktivität. Dargestellt wurde dabei die Gesamt-PLA₂-Aktivität, da bei dieser Messung ohne spezifische Inhibitoren gearbeitet wurde und somit auch die Aktivität anderer Phospholipasen A₂ mitgemessen wurde. Ein Nachteil dieser durchflusszytometrischen Messung besteht zudem darin, dass die unterschiedlich starke Expression der verschiedenen iPLA₂-Konstrukte (siehe Abbildung 3.1D) nicht berücksichtigt werden kann. Deshalb wurde zusätzlich ein *in vitro*-iPLA₂-Aktivitätstest angewendet, mit dem durch Verwendung des iPLA₂-Inhibitors Bromenollacton (BEL) die spezifische iPLA₂-Aktivität in Zelllysaten bestimmt werden konnte. Zudem wurde in den jeweiligen Zelllysaten die Expression der iPLA₂-Konstrukte mittels eines anti-FLAG-ELISA relativ quantifiziert (siehe 2.3.10) und darüber die gemessene iPLA₂-Aktivität normiert. Zur Bestimmung der iPLA₂-Aktivität wurden die Zelllysate in Calcium-freiem Puffer mit Substrat in An- oder Abwesenheit von BEL inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch die spezifische Aktivität der 26-kDa-Form von iPLA₂ deutlich höher war als die des Volllängenproteins oder der p32-Form (Abbildung 3.2B).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Prozessierung der Volllängen-iPLA₂ durch Caspase-3 zum 26-kDa-Fragment und damit die Abspaltung der N-terminalen Ankyrin-Motive und des C-Terminus zu einer starken Aktivitätssteigerung der iPLA₂ auch in vitalen Zellen führt.

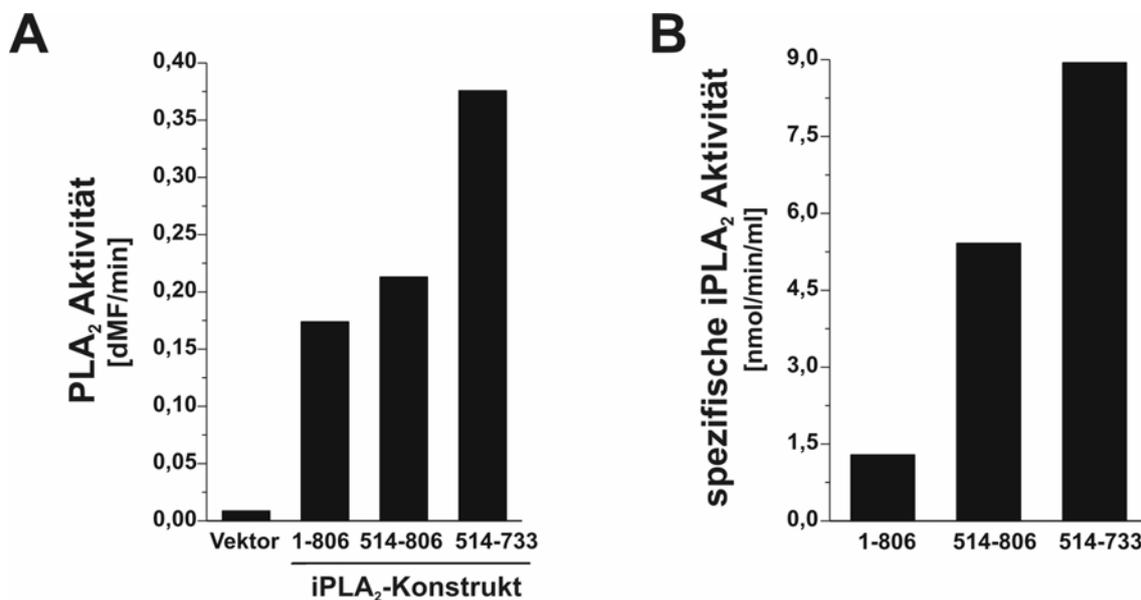


Abbildung 3.2: iPLA₂ aa514-733 zeigt eine deutlich höhere Aktivität als die Volllängen-Form von iPLA₂.

(A) Durchflusszytometrische Messung der iPLA₂-Aktivität. MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben unter Verwendung des Lipofektionsagens FuGENETM6 mit iPLA₂ aa1-806 (N-FLAG) und den trunkierten Formen aa514-806 und aa514-733 (beide C-FLAG) oder dem Leervektor transfiziert. 26 h nach Transfektion wurden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 200 μ L HBSS mit 20 ng/ μ L BBPC beladen und durchflusszytometrisch über 90 min analysiert (siehe 2.2.7). Für die so erhaltenen Kurven wurde die Steigung ermittelt und die Aktivität als Δ mittlere Fluoreszenz/Minute angegeben.

(B) *In vitro*-iPLA₂-Aktivitätstest. Wie unter 3.2A wurden MCF7_{casp3} Zellen mit den unterschiedlichen iPLA₂-Formen transfiziert. Nach 30 h wurden die Zellen lysiert, und mit 20 μ g Gesamtprotein pro Kavität einer 96-well-Reaktionsplatte wurde der *in vitro*-iPLA₂-Aktivitätstest in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors BEL (24 μ M) wie unter 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Die daraus

berechnete Aktivität wurde zusätzlich mit der aus denselben Proben ermittelten relativen Expression der iPLA₂-FLAG-Formen (anti-FLAG-ELISA, siehe 2.3.10) multipliziert und somit auf diese normiert.

3.2 Produktion und Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose

3.2.1 Nachweis von Lysophosphatidylcholin in den Überständen apoptotischer Zellen

Zur Messung des von apoptotischen Zellen freigesetzten Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin (LPC), das durch die iPLA₂-vermittelte Spaltung von Phosphatidylcholin entsteht (Lauber et al., 2003), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein direkter quantitativer Nachweis von LPC erfolgen. Dazu wurden aus den serumfreien Überständen von vitalen und apoptotischen MCF7_{casp3} Zellen die Lipide durch eine Methanol/Chloroform-Extraktion nach Bligh-Dyer (Bligh und Dyer, 1959) extrahiert, unter Stickstoffatmosphäre getrocknet und mittels eines enzymatischen Tests LPC nachgewiesen (Kishimoto et al., 2002).

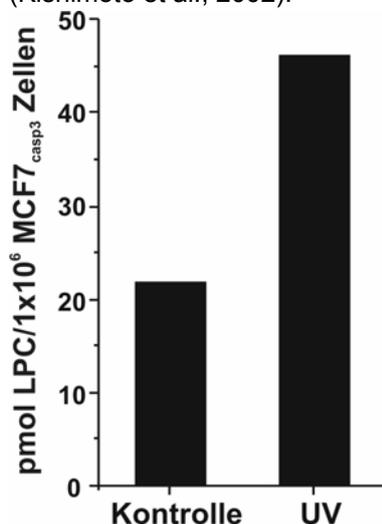


Abbildung 3.3: MCF7_{casp3} Zellen setzen während der Apoptose Lysophosphatidylcholin frei.

Wie unter 2.2.4 beschrieben, wurde in MCF7_{casp3} Zellen mit 10 mJ/cm² UV-Bestrahlung Apoptose induziert bzw. die Zellen unbehandelt gelassen (Kontrolle) und je 2 x 10⁶ Zellen in 1 mL serumfreiem Medium für 13 h inkubiert. Danach wurden die Lipide mit Methanol/Chloroform aus den Überständen extrahiert und unter Stickstoff getrocknet. Der LPC-Nachweis erfolgte wie unter 2.3.12 beschrieben durch den enzymatischen Abbau von LPC mit den Lipiden von 4 x 10⁶ Zellen pro Probe. Die Fluoreszenz des dabei umgesetzten Farbstoffs Amplex Ultra Red wurde über 45 min 1x pro Minute gemessen (Anregung: 530 nm, Emission: 595 nm) und daraus die Zunahme der Fluoreszenz/min ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte über die lineare Regression einer Standardreihe mit gereinigtem LPC.

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, konnte in den Überständen apoptotischer Zellen etwa die doppelte Menge LPC nachgewiesen werden im Vergleich zu Überständen vitaler Zellen. Dabei setzten 1 x 10⁶ MCF7_{casp3} Zellen nach UV-Bestrahlung knapp 50 pmol LPC frei. Dies entspricht bei einem Ansatz von 2 x 10⁶ Zellen pro mL Überstand einer Konzentration von ca. 100 nM. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen bestätigt werden.

3.2.2 Aktive iPLA₂ ist essentiell für die Generierung des Attraktionssignals, alleine jedoch nicht hinreichend für dessen Freisetzung

Wie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 gezeigt, wird die 86-kDa-Volllängenform von iPLA₂ während der Apoptose durch Caspase-3 zu einem 26 kDa großen Fragment (aa514-733) prozessiert und damit aktiviert. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Aktivierung von iPLA₂ das ausschlaggebende Ereignis für die Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin ist. Eine Beteiligung der Calcium-abhängigen Phospholipase A₂ (cPLA₂) an diesem Prozess konnte durch

Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Lauber et al., 2003) und anderer Gruppen (Atsumi et al., 2000) ausgeschlossen werden.

Dazu wurde in MCF7_{casp3} Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des iPLA₂-Inhibitors Bromenollacton (BEL) mit verschiedenen Stimuli Apoptose induziert und, wie in Abbildung 3.4A dargestellt, die Freisetzung apoptotischer Attraktionssignale indirekt über die Migration von THP-1 Monozyten im Transmigrationstest bestimmt. Neben UV-Bestrahlung wurden als Apoptosestimuli das Chemotherapeutikum Mitomycin C und der Kinaseinhibitor Staurosporin verwendet. Das chemotaktische Potential war in den Überständen der mit verschiedenen Stimuli behandelten Zellen ohne Inhibitor zum Teil unterschiedlich und nach Mitomycin-C-Behandlung schwächer als nach UV-Bestrahlung und Staurosporin-Stimulation. In den Überständen der nicht behandelten Kontrollzellen konnte wie erwartet kein chemotaktisches Potential nachgewiesen werden. Die Hemmung der iPLA₂ durch BEL führte bei allen Apoptose-Stimuli konzentrationsabhängig zu einer verminderten Freisetzung des Attraktionssignals und damit zu einer geringeren Migration der THP-1 Monozyten. Ab einer Konzentration von 10 - 15 µM BEL konnte in den Überständen kein chemotaktisches Potential mehr nachgewiesen werden. Da die Überstände vor den Transmigrationstests zur Entfernung der eingesetzten niedermolekularen Agenzien (BEL, Staurosporin und Mitomycin C) über Sephadex G15-Säulen filtriert wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass BEL und die eingesetzten Apoptose-Stimuli selbst inhibitorisch auf die Migrationsfähigkeit der THP-1 Monozyten wirkten.

BEL inhibiert innerhalb der PLA₂-Familie spezifisch die Calcium-unabhängigen Phospholipasen, dabei kann jedoch nicht zwischen verschiedenen iPLA₂-Isoformen (iPLA₂α – η) unterschieden werden (Jenkins et al., 2004; Larsson et al., 1998; Mancuso et al., 2000; Tanaka et al., 2000; Tang et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden iPLA₂-Expressionskonstrukte verwendet, die ausgehend von der 86 kDa iPLA₂β-Isoform (aa1-806) hergestellt wurden (Larsson et al., 1998). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Prozessierung und Aktivierung von iPLA₂β alleine für die LPC-Freisetzung verantwortlich ist oder ob weitere Calcium-unabhängige Phospholipasen A₂ an der Generierung des Attraktionssignals beteiligt sind, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Dazu wurden die R- und S-Enantiomere von BEL verwendet, die spezifisch die Isoformen iPLA₂β (S-BEL) bzw. iPLA₂γ (R-BEL), eine 63 kDa große peroxisomal lokalisierte iPLA₂, inhibieren (Jenkins et al., 2002; Yan et al., 2005). Dabei ist in Abbildung 3.4B deutlich zu sehen, dass sich die Freisetzung des Attraktionssignals sowohl durch das BEL-Racemat sowie durch S-BEL komplett inhibieren ließ. R-BEL hatte keinerlei Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Isoform iPLA₂β für die Generierung des Attraktionssignals verantwortlich war, da S-BEL spezifisch diese Isoform inhibiert. iPLA₂γ, die durch R-BEL gehemmt wird, schien dagegen keinerlei Einfluss zu haben.

Um auszuschließen, dass BEL selbst die Apoptose inhibiert und es dadurch zu einer verminderten Freisetzung von chemotaktischem Lockstoff kommt, wurde der Einfluss von BEL auf die Spaltung des Caspase-Substrats Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) untersucht. Es wurde in MCF7_{casp3} Zellen durch UV-Bestrahlung bzw. Staurosporin- oder Mitomycin-C-Behandlung Apoptose induziert und in An- oder Abwesenheit der höchsten in Abbildung 3.4A verwendeten BEL-Konzentration inkubiert. Wie in Abbildung 3.4C gezeigt, wurden die Zellen nach den angegebenen Zeiten geerntet und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Bei allen verwendeten Apoptose-Stimuli war eine deutliche Spaltung

der 116-kDa-Form von PARP zum 85-kDa-Spaltfragment zu erkennen, die in den vitalen Kontrollzellen nicht auftrat. Die Behandlung der Zellen mit BEL und damit die Inhibierung von $iPLA_2$ hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Caspase-vermittelte Prozessierung von PARP. Die mit einem Sternchen gekennzeichnete Bande bezeichnet ein unspezifisches Signal des anti-PARP-Antikörpers.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass aktive $iPLA_2\beta$ essentiell für die Generierung des Attraktionssignals LPC während der Apoptose ist.

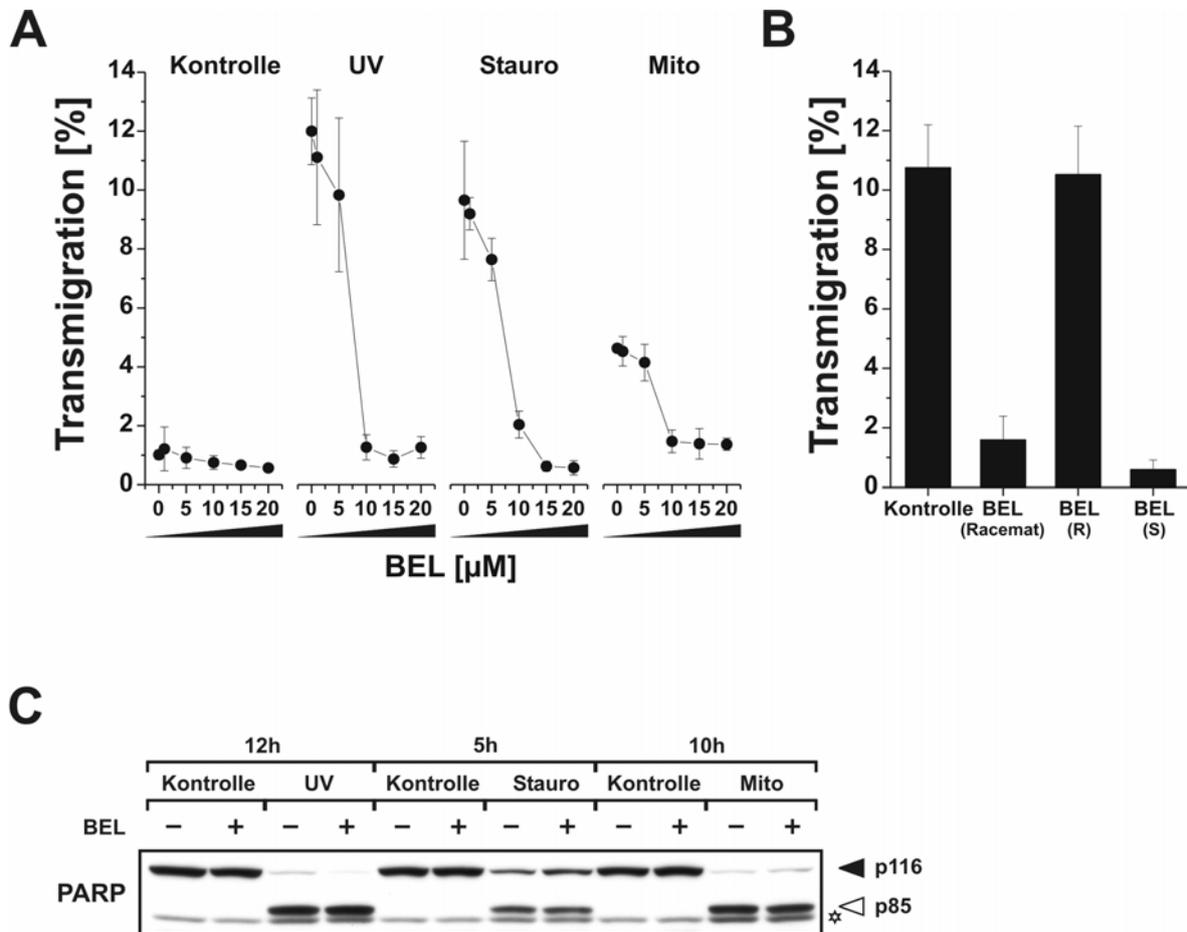


Abbildung 3.4: Die Inhibierung der $iPLA_2$ führt zur Hemmung der LPC-Freisetzung.

(A) Apoptoseinduktion durch verschiedene Stimuli und Inhibierung von $iPLA_2$. In $MCF7_{casp3}$ Zellen (2×10^6 Zellen/Probe) wurde mit unterschiedlichen Stimuli Apoptose induziert (10 mJ/cm^2 UV-Licht, $2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin, $25 \mu\text{g/mL}$ Mitomycin C bzw. unbehandelte Kontrollen) und in 2 mL serumfreiem Medium für 13 h in Anwesenheit steigender Konzentrationen BEL inkubiert. Mit den über Sephadex G15-Säulen filtrierten Überständen wurde wie unter 2.2.10 beschrieben ein Transmigrationstest mit THP-1 Monozyten durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus Triplikaten.

(B) Inhibierung verschiedener $iPLA_2$ -Isoformen. 2×10^6 $MCF7_{casp3}$ Zellen wurden mit 10 mJ/cm^2 UV-Licht bestrahlt und in An- oder Abwesenheit von $20 \mu\text{M}$ BEL ($iPLA_2$ -Inhibitor, Racemat), R-BEL (inhibiert $iPLA_2\gamma$) oder S-BEL (inhibiert $iPLA_2\beta$) für 13 h inkubiert. Die Transmigration wurde wie unter 3.4A durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardabweichung aus Triplikaten.

(C) BEL hat keinen Einfluss auf die Apoptose. In $MCF7_{casp3}$ Zellen wurde wie unter 3.4A angegeben mit verschiedenen Stimuli Apoptose induziert und für die angegebenen Zeiten in An- bzw. Abwesenheit von $20 \mu\text{M}$ BEL inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und pro Probe $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein über ein SDS-PAGE-Gel ($8 - 15 \%$) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spaltung des Caspase-Substrats PARP wurde im Westernblot mit einem anti-PARP-Antikörper nachgewiesen.

Im vorangegangenen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die prozessierte Form von $iPLA_2$ eine deutlich höhere Aktivität als die Volllängenform hat (Abschnitt 3.1.2) und dass aktive $iPLA_2$ essentiell für die Freisetzung des Attraktionssignals LPC ist (Abbildung 3.4). Außerdem konnten

Atsumi et al. belegen, dass nach Überexpression der Vollängen-iPLA₂ mehr Arachidonsäure von vitalen HEK293 Zellen freigesetzt wurde, was durch Expression der trunkierten Form iPLA₂ aa184-806 noch gesteigert werden konnte (Atsumi et al., 2000). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob die Überexpression der trunkierten, aktiven iPLA₂ alleine hinreichend für die Generierung und Freisetzung von LPC ist. Um dies zu untersuchen, wurden in MCF7_{casp3} Zellen die iPLA₂-Formen aa1-806 (Volllänge), aa1-512 (Ankyrin-Motive ohne aktives Zentrum) und aa514-733 (26-kDa-Spaltfragment) überexprimiert bzw. die Zellen mit dem Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden UV-bestrahlt oder unbehandelt gelassen und mit den so gewonnenen Überständen wurden Transmigrationstests durchgeführt. Abbildung 3.5A zeigt, dass die Überexpression aktiver iPLA₂ nach UV-Bestrahlung zu einem deutlich gesteigerten chemotaktischen Potential der Überstände führte und eine höhere Migrationsrate der eingesetzten THP-1 Monozyten nachgewiesen werden konnte. Die Expression der N-terminalen Ankyrin-Motive (aa1-512) hatte weder einen hemmenden noch einen fördernden Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände. Jedoch führte die Expression aktiver iPLA₂ (aa514-733) in vitalen Zellen nicht zu einer Freisetzung von LPC, wie bereits zuvor von Lauber et al. gezeigt (Lauber et al., 2003). Abbildung 3.5B zeigt die Expression der verschiedenen FLAG-getaggten iPLA₂-Formen im Westernblot, wobei die Vollängenform deutlich stärker exprimiert wurde als die beiden trunkierten Konstrukte. Die Sternchen bezeichnen unspezifische Signale des anti-FLAG-Antikörpers.

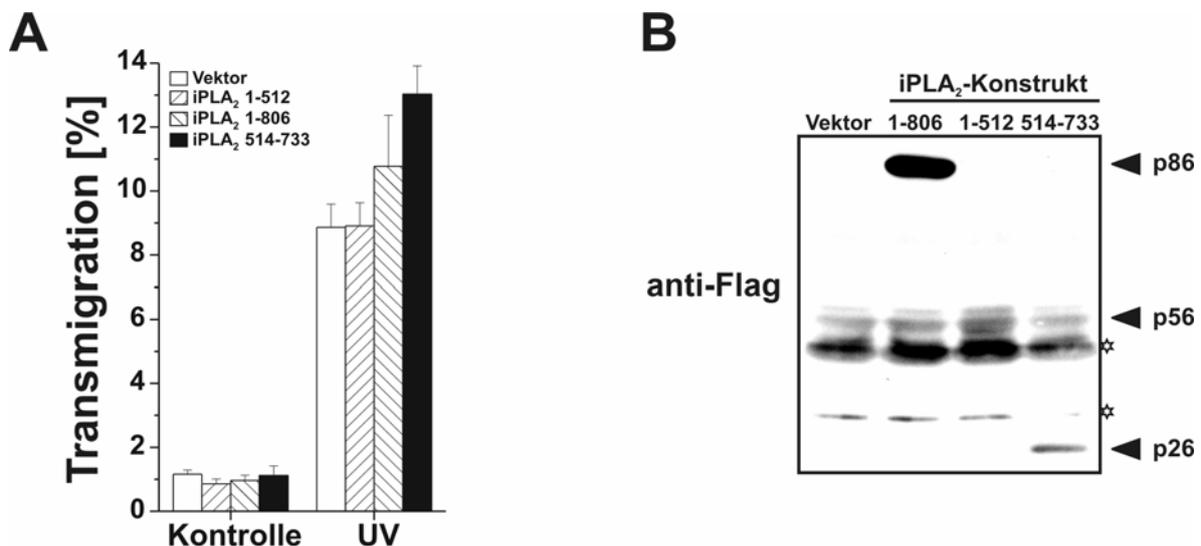


Abbildung 3.5: Die Überexpression der aktiven iPLA₂ alleine führt nicht zur LPC-Freisetzung.

(A) Überexpression verschiedener iPLA₂-Formen und Transmigration. 3×10^5 MCF7_{casp3} Zellen pro Kavität einer 6-well-Zellkulturplatte wurden mit Hilfe von FuGENETM6 wie unter 2.2.3 beschrieben mit iPLA₂ aa1-806 (N-FLAG) und den trunkierten Formen aa514-733 und aa1-512 (beide C-FLAG) transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 mJ/cm^2 UV-Licht bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen (Kontrolle) und für 13 h in 2 mL serumfreiem Medium inkubiert. Mit den Überständen wurde wie unter 2.2.10 beschrieben ein Transmigrationstest mit THP-1 Monozyten durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardabweichung aus Triplikaten.

(B) Überexpression verschiedener iPLA₂-Formen und Westernblot. Wie unter 3.5A wurden MCF7_{casp3} Zellen mit verschiedenen iPLA₂-Konstrukten transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und das Lysat von 3×10^5 Zellen pro Probe in einer 8 - 15 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression der FLAG-getaggten iPLA₂-Formen wurde im Westernblot mit einem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass iPLA₂ während der Apoptose durch Caspase-3 gespalten und dadurch aktiviert wird. Außerdem ist aktive iPLA₂β absolut

notwendig zur Generierung des Attraktionssignals LPC, das von apoptotischen Zellen freigesetzt wird. Jedoch setzen vitale Zellen, die die trunkierte aktive Form von iPLA₂ exprimieren, spontan kein solches Attraktionssignal frei. Daraus muss gefolgert werden, dass es neben der Spaltung und Aktivierung von iPLA₂ weitere Mechanismen gibt, die für die Produktion und Freisetzung von LPC während der Apoptose notwendig sind. Im Folgenden sollte deshalb geklärt werden, welche apoptotischen Ereignisse für die Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals mitverantwortlich sind.

3.2.3 Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung des Attraktionssignals in apoptotischen Zellen

Ein in der Literatur häufig beschriebenes und eng mit der Apoptose assoziiertes Phänomen ist oxidativer Stress. Dieser entsteht während der Apoptose vor allem durch die Unterbrechung des mitochondrialen Elektronentransports der Atmungskette und den dabei freiwerdenden reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (Kagan et al., 2003). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Oxidation von Phospholipiden, die insbesondere Phosphatidylserin betrifft, jedoch auch für Phosphatidylcholin nachgewiesen werden konnte (Huber et al., 2002; Kagan et al., 2002). Perez et al. konnten zeigen, dass nach H₂O₂-induzierter Apoptose in U937 Zellen der iPLA₂-vermittelte Phospholipid-Um- und Abbau deutlich erhöht ist (Perez et al., 2004). Außerdem beobachteten sie, dass das dabei entstehende LPC wichtig für die nachfolgende Phagozytose dieser Zellen ist; dies gilt jedoch nicht nach Apoptose-Induktion mit TNF- α (Perez et al., 2006). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Phospholipidoxidation bei der Generierung des löslichen Attraktionssignals LPC eine Rolle spielt, wenn nicht durch oxidativen Stress Apoptose induziert wird, sondern, wie in der vorliegenden Arbeit, durch andere Stimuli, wie z.B. UV-Bestrahlung.

Dazu wurden MCF7_{casp3} Zellen mit dem Antioxidanz α -Tocopherol (Vitamin E) vorbehandelt, das die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen fördert und dadurch Lipide vor Oxidation schützen kann. Nach 30-stündiger Inkubation der Zellen mit steigenden Mengen α -Tocopherol wurden die Zellen gewaschen und durch UV-Bestrahlung Apoptose induziert bzw. die Zellen unbehandelt gelassen. Wie in Abbildung 3.6A dargestellt, führte dies zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung des chemotaktischen Potentials in den Überständen apoptotischer Zellen; mit Tocopherol-Konzentrationen von 50 und 100 μ M wurde die Freisetzung des Attraktionssignals und damit die Migration von THP-1 Monozyten fast vollständig gehemmt. Mit der höchsten eingesetzten Tocopherol-Konzentration von 100 μ M wurde daraufhin untersucht, inwieweit Vitamin E die Zellen vor der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen schützen konnte. Abbildung 3.6B zeigt eine deutlich verminderte Menge an ROS nach UV-Bestrahlung in den Tocopherol-behandelten gegenüber den ungeschützten Zellen. Die ROS-Entstehung während der Apoptose konnte jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht vollständig unterdrückt werden. Dies liegt vermutlich daran, dass α -Tocopherol in die Zellmembran eingelagert wird und auch nur dort wirken kann; cytosolische ROS sind dadurch nicht betroffen und können hier nicht reduziert werden.

Um auszuschließen, dass Vitamin E selbst die Apoptose beeinflusst und deshalb weniger LPC freigesetzt wurde, wurde die Apoptoserate nach Tocopherol-Behandlung anhand der Bestimmung hypodiploider Nuklei überprüft. Abbildung 3.6C zeigt, dass die Apoptoserate der Vitamin-E-

behandelten Zellen nach UV-Bestrahlung sogar etwas verstärkt war gegenüber den unbehandelten Zellen. Somit kann das verminderte chemotaktische Potential der Überstände und die geringere ROS-Entstehung nach Vitamin-E-Behandlung nicht auf eine Inhibierung der Apoptose zurückgeführt werden.

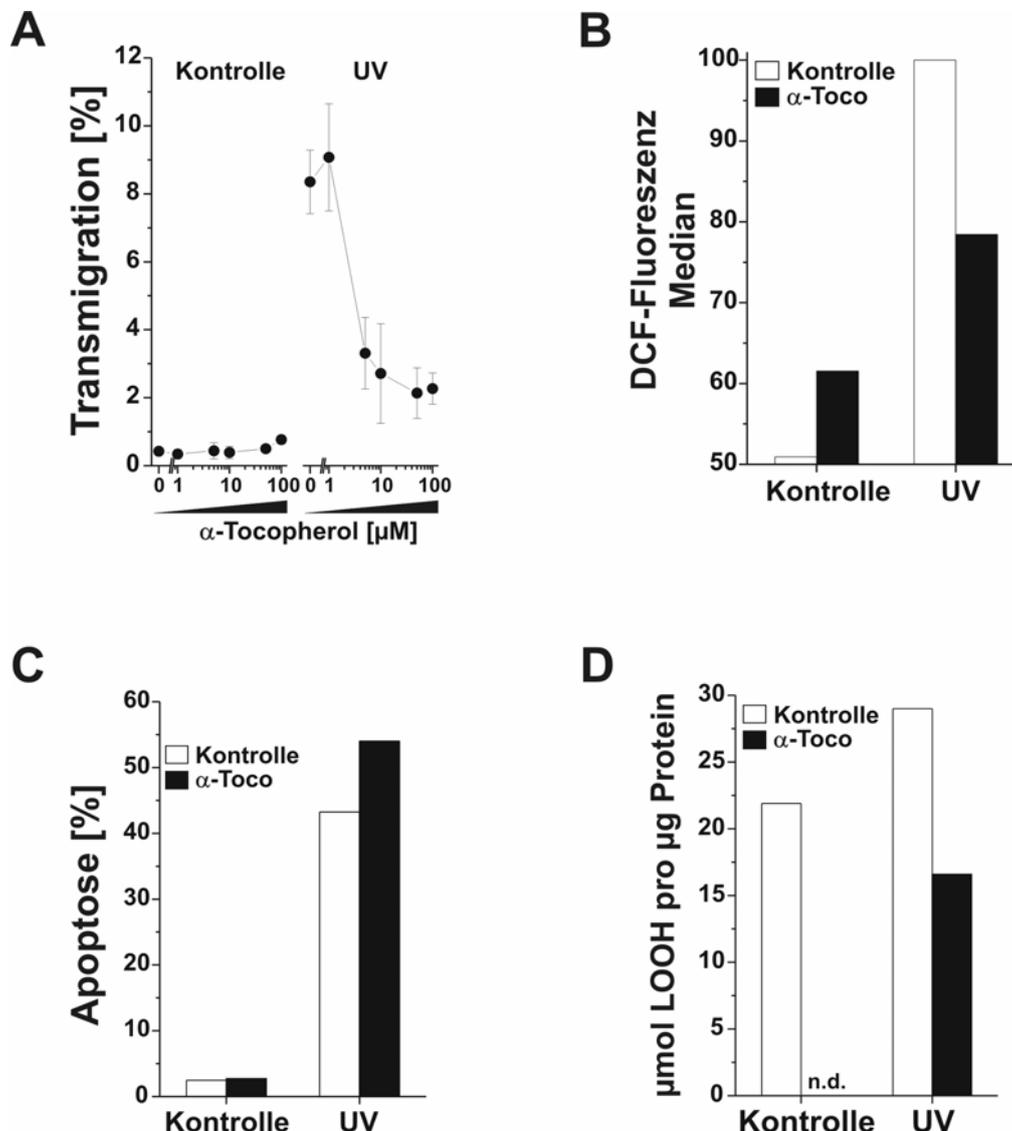


Abbildung 3.6: Durch α-Tocopherol-Behandlung kann die Lipid-Peroxidation und die Freisetzung von Attraktionssignalen während der Apoptose inhibiert werden.

(A) α-Tocopherol und Transmigration. Nach 30 h Inkubation mit steigenden Konzentrationen α-Tocopherol (1 - 100 µM) im Zellkulturmedium wurde in MCF7_{casp3} Zellen mit 10 mJ/cm² UV-Bestrahlung Apoptose induziert bzw. die Zellen unbehandelt gelassen (Kontrolle) und in 2 mL serumfreiem Medium für 13 h inkubiert (2 x 10⁶ Zellen/Probe). Mit den Überständen wurde wie unter 2.2.10 beschrieben mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.

(B) α-Tocopherol und ROS. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit 100 µM α-Tocopherol für 30 h inkubiert und mit dem Farbstoff CM-H₂DCFDA (10 µM) beladen. Dann wurden 4 x 10⁵ Zellen pro Probe mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen (Kontrolle) und nach 13 h Inkubation im Durchflusszytometer die grüne Fluoreszenz (F11) analysiert (siehe 2.2.8).

(C) α-Tocopherol und Apoptoserate. MCF7_{casp3} Zellen wurden für 30 h mit 100 µM α-Tocopherol kultiviert und danach je 2 x 10⁶ Zellen pro Kavität einer 6-well-Platte mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen (Kontrolle). 24 h nach Apoptose-Induktion wurde im Durchflusszytometer die Apoptoserate durch Färbung der im Zellkern enthaltenen DNA mit Propidiumiodid und Bestimmung des Anteils hypodiploider Nuclei gemessen (siehe 2.2.9.1).

(D) α-Tocopherol und Lipid-Peroxidation. MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 3.6C behandelt und 6 h nach UV-Bestrahlung geerntet. In den Zellen (2 x 10⁵ pro Probe) wurde wie unter 2.2.8 beschrieben die Menge an Lipid-Hydroperoxiden spektrometrisch bestimmt. (n.d. = nicht detektierbar)

Um die Auswirkungen von oxidativem Stress an der Zellmembran, also dem Ort der LPC-Entstehung, besser untersuchen zu können, wurde die Menge an Lipid-Hydroperoxiden (LOOH) in vitalen und UV-bestrahlten Zellen mit und ohne Tocopherol-Behandlung bestimmt. LOOH entstehen durch die ROS-vermittelte Peroxidation von Lipiden und Phospholipiden an Zellmembranen. Abbildung 3.6D zeigt, dass in apoptotischen Zellen mehr Lipid-Hydroperoxide gebildet wurden als in vitalen MCF7_{casp3} Zellen. Durch Tocopherol-Vorbehandlung konnte in den apoptotischen Zellen die LOOH-Bildung deutlich vermindert werden, in vitalen Zellen wurde die LOOH-Menge durch Vitamin E sogar bis unter die Nachweisgrenze reduziert.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass der während der Apoptose auftretende oxidative Stress in Form von ROS zu einer gesteigerten Lipid-Peroxidation und damit vermutlich zu einer verstärkten Hydrolyse von oxidierten Phospholipiden, wie z.B. Phosphatidylcholin, führen kann. Dadurch kann offenbar mehr LPC generiert und freigesetzt werden. Somit scheint neben der Prozessierung und Aktivierung der iPLA₂ auch die Lipid-Peroxidation während der Apoptose für die Generierung des Attraktionssignals LPC eine wichtige Rolle zu spielen.

3.2.4 Die Inhibierung von ABCA-Transportern hemmt die Freisetzung des Attraktionssignals

LPC wird als apoptotisches Attraktionssignal nach der iPLA₂-vermittelten hydrolytischen Spaltung von Phosphatidylcholin externalisiert und freigesetzt (Lauber et al., 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit, wie in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt, bestätigt werden. Der genaue Mechanismus der LPC-Externalisierung in apoptotischen Zellen war bislang jedoch unklar und sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Die Externalisierung von Phospholipiden während der Apoptose wurde bislang am besten für Phosphatidylserin als zentralem Marker der Apoptose untersucht, der Mechanismus bis jetzt jedoch nur unvollständig aufgeklärt. Die PS-Externalisierung wird demnach v.a. durch die Inaktivierung der Aminophospholipid-Translokase und der Aktivierung einer Lipid-Scramblase ermöglicht (Beveris et al., 1999; Bratton et al., 1997; Williamson und Schlegel, 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass Mitglieder der *ATP-binding cassette transporter* (ABC)-Familie, insbesondere ABCA1 und ABCA7, für den Efflux verschiedener Phospholipide und Cholesterin in vitalen Zellen verantwortlich sind (Abe-Dohmae et al., 2004; Wang et al., 2003; Wang und Tall, 2003). Alder-Baerens et al. und Hamon et al. beschrieben zudem, dass speziell ABCA1 an der PS-Externalisierung mitbeteiligt und wichtig für die Phagozytose apoptotischer Zellen ist (Alder-Baerens et al., 2005; Hamon et al., 2000). Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob ABCA-Transporter auch an der Freisetzung des Attraktionssignals LPC während der Apoptose beteiligt sind.

Dazu wurde, wie in Abbildung 3.7A dargestellt, in MCF7_{casp3} Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen des ABCA-Inhibitors Glyburid Apoptose induziert. Dies führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des chemotaktischen Potentials der Überstände, wodurch weniger THP-1 Monozyten in diese Überstände migrierten. Das chemotaktische Potential der mit unterschiedlichen Apoptose-Stimuli ohne Inhibitor behandelten Proben war unterschiedlich und nach Apoptose-Induktion mit Staurosporin und Mitomycin C geringer als nach UV-Bestrahlung. Es konnte

jedoch bei allen drei Stimuli mit der höchsten eingesetzten Glyburid-Konzentration von 100 μM sehr deutlich reduziert werden, nach UV-Bestrahlung von über 20 % Transmigration auf etwa 6 %, nach Mitomycin-C-Behandlung sogar vollständig. Da die Überstände vor den Transmigrationstests zur Entfernung der niedermolekularen Apoptose-Stimuli und des Inhibitors über Sephadex G15-Säule filtriert wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass Glyburid selbst die Migration der THP-1 Monozyten inhibierte.

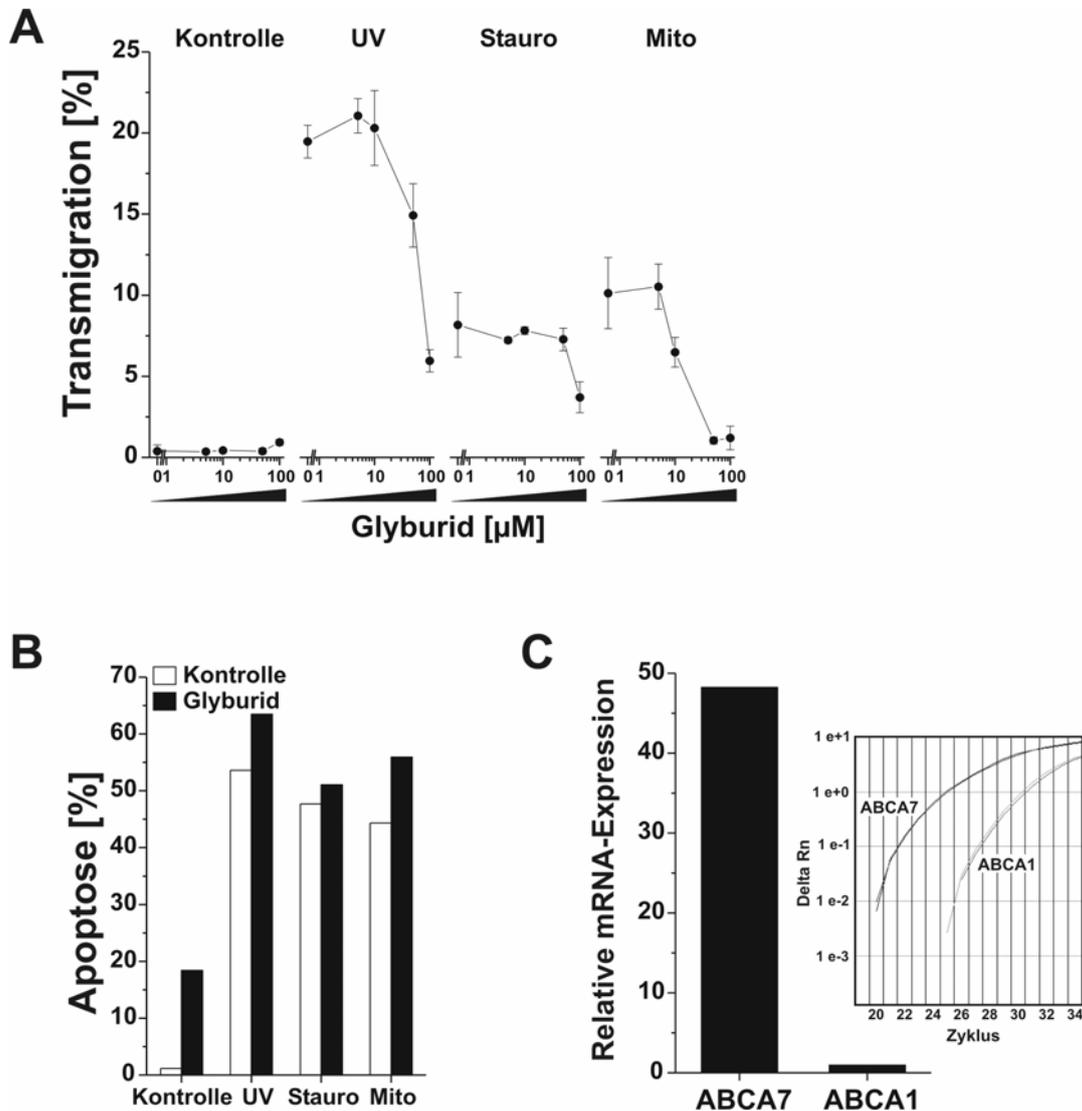


Abbildung 3.7: Der ABCA-Inhibitor Glyburid hemmt die Freisetzung des Attraktionssignals aus apoptotischen MCF7_{casp3} Zellen.

(A) Apoptoseinduktion durch verschiedene Stimuli und Inhibierung von ABCA-Transportern. In MCF7_{casp3} Zellen (2×10^6 Zellen/Probe) wurde mit unterschiedlichen Stimuli Apoptose induziert (10 mJ/cm^2 UV-Bestrahlung, 2,5 μM Staurosporin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mitomycin C bzw. unbehandelte Kontrollen) und in 2 mL serumfreiem Medium für 13 h in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Glyburid (1 - 100 μM) inkubiert. Mit den filtrierten Überständen wurde wie unter 2.2.10 beschrieben ein Transmigrationstest mit THP-1 Monozyten durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus Triplikaten.

(B) Apoptoserate nach Glyburidbehandlung. In MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 3.7A Apoptose induziert, mit oder ohne 100 μM Glyburid inkubiert und 24 h nach Apoptoseinduktion der Anteil apoptotischer Zellen durch Propidiumiodidfärbung der nukleären DNA durchflusszytometrisch bestimmt.

(C) mRNA-Expression von ABCA1 und ABCA7. Aus MCF7_{casp3} Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit 1 μg RNA die reverse Transkription durchgeführt. Mittels *real-time* PCR wurde die Expression von ABCA1 und ABCA7 bestimmt und über das interne Standardgen ALAS-1 normiert. Unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienzen wurden die Proben relativ zueinander quantifiziert (siehe 2.4.4). Rechts ist die primäre Amplifikationskurve dargestellt.

Um sicherzustellen, dass Glyburid keinen Einfluss auf die Apoptose hatte und deshalb weniger Attraktionssignal freigesetzt wurde, wurden die Zellen mit der höchsten Glyburid-Konzentration (100 μ M) und den unterschiedlichen Apoptose-Stimuli (bzw. Kontrolle) nach 24 h mittels Propidiumiodid-Färbung der nukleären DNA analysiert. In Abbildung 3.7B ist deutlich zu sehen, dass Glyburid in keinem Fall die Apoptose inhibierte, sondern die Apoptoserate sowohl in den vitalen Kontrollzellen als auch in den apoptotischen Zellen sogar leicht erhöhte.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass ABCA-Transporter bei der Freisetzung des Attraktionssignals LPC eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Da der Inhibitor Glyburid sowohl ABCA1 als auch ABCA7 inhibieren kann, sollte näher definiert werden, ob möglicherweise beide Transporter an der LPC-Freisetzung beteiligt sind, oder aber nur einer der beiden. In Abbildung 3.7C ist die relative Expression der ABCA7- und ABCA1-mRNA in MCF7_{casp3} Zellen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass ABCA7 etwa 40 Mal stärker exprimiert wurde als ABCA1. Dieser deutliche Unterschied wies darauf hin, dass möglicherweise ABCA7 bei der LPC-Freisetzung eine größere Rolle spielen könnte als ABCA1. Deshalb wurde im Folgenden zunächst die Beteiligung des ABCA7-Transporters an der LPC-Freisetzung untersucht.

3.2.5 Für die Freisetzung des Attraktionssignals aus apoptotischen Zellen ist ABCA1 essentiell, nicht ABCA7

Um zu untersuchen, ob die LPC-Freisetzung während der Apoptose von der ABCA7-Expression abhängig ist, sollte nun die Expression dieses Transporters durch die Behandlung von MCF7_{casp3} Zellen mit siRNA reduziert werden. Durch Vorversuche wurde der Zeitpunkt ermittelt, an dem die Expression von ABCA7 in diesen Zellen am stärksten inhibiert war. Abbildung 3.8A zeigt, dass der *knock down* von ABCA7 mit den beiden spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (nt426 und nt1676) zu einer deutlichen Reduktion der ABCA7-mRNA im Vergleich zu den mit Kontroll-Oligonukleotid (*Scramble*) transfizierten MCF7 Zellen führte. Aufgrund dessen, dass kein ABCA7-Antikörper für eine Westernblot-Analyse verfügbar war, konnte die ABCA7-Expression leider nicht auf Proteinebene untersucht werden. Nach dem *knock down* wurden die Zellen UV-bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen und mit den Überständen Transmigrationstests durchgeführt. Wie in Abbildung 3.8B dargestellt hatte der *knock down* von ABCA7 mit beiden funktionellen siRNA-Oligonukleotiden jedoch keinen Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände nach UV-Bestrahlung und die eingesetzten THP-1 Monozyten migrierten ebenso stark wie auf die Überstände der mit Kontroll-Oligonukleotid behandelten Zellen.

Obwohl für ABCA7 ein deutlich höheres mRNA-Niveau beobachtet werden konnte als für ABCA1 (siehe Abbildung 3.7C), scheint ABCA7 für die Freisetzung des Attraktionssignals LPC keine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Deshalb sollte eine mögliche Beteiligung von ABCA1 näher untersucht werden.

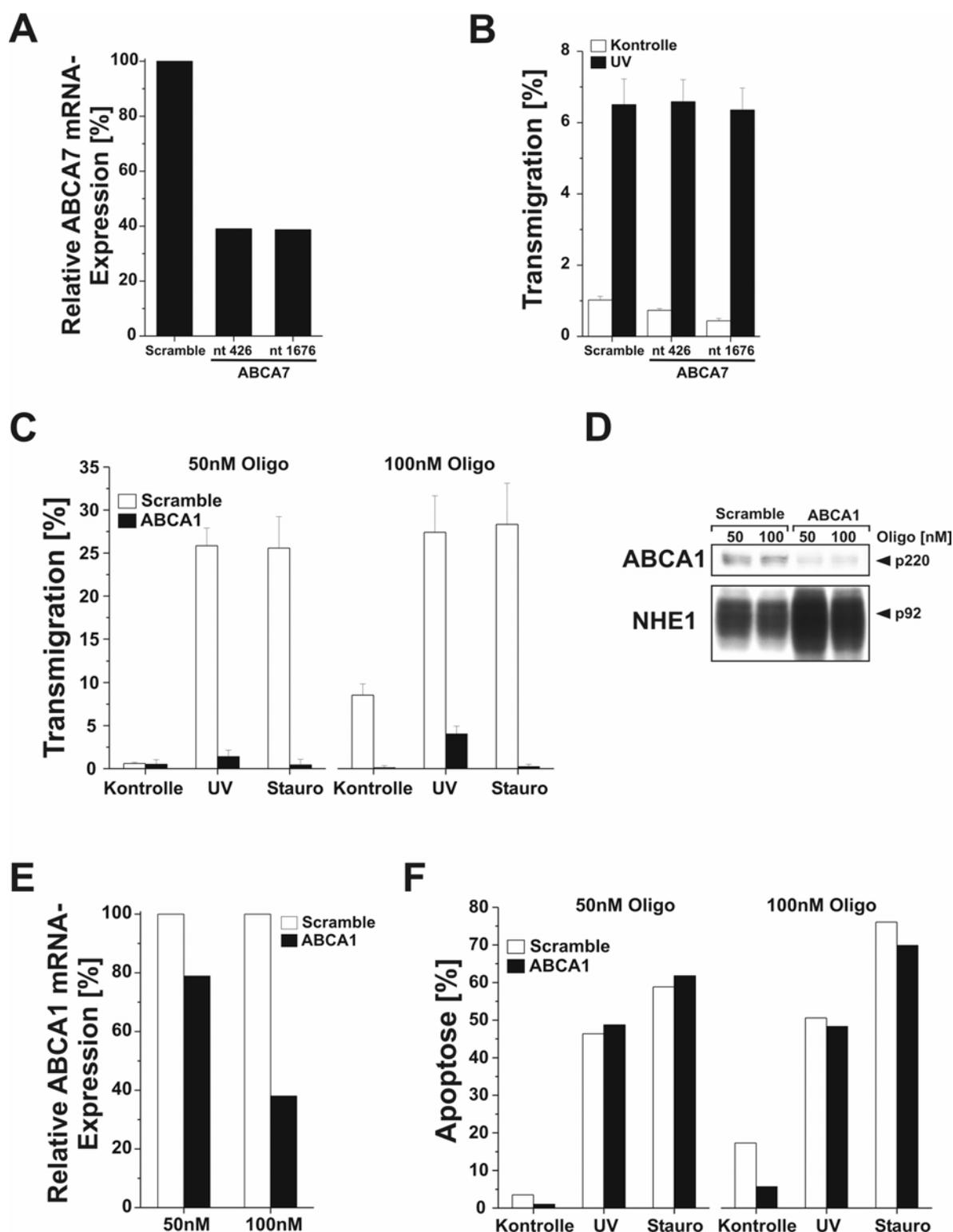


Abbildung 3.8: Durch den *knock down* von ABCA1 wird die Freisetzung des Attraktionssignals gehemmt.

(A) ABCA7 mRNA-Expression nach knock down. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit Hilfe des Lipofektionsagens Lipofectamin™2000 (5 µL pro Kavität einer 6-well-Platte) mit 100 nM ABCA7 siRNA bzw. *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert (Tag 5 und 2 vor RNA-Isolierung), dann wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und 1 µg revers transkribiert. Zur Bestimmung der ABCA7 mRNA-Expression wurden pro Probe 80 ng cDNA mittels *real-time* PCR analysiert. Die Proben wurden intern auf die ALAS-1-mRNA-Expression normiert und die mit Kontroll-Oligonukleotid behandelten Proben gleich 100 % gesetzt.

(B) Transmigration nach knock down von ABCA7. MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 3.8A mit verschiedenen ABCA7 siRNA-Oligonukleotiden behandelt (Tag 5 und 2 vor Apoptose-Induktion), dann wurden die Zellen frisch ausgesät (2 x 10⁶ Zellen pro Probe) und nach Erreichen der Adhärenz mit 10 mJ/cm² UV-Bestrahlung Apoptose induziert bzw. nicht behandelt

(Kontrolle). Nach 13 h wurden die serumfreien Zellkulturüberstände geerntet (2 mL) und mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

(C) Transmigration nach *knock down* von ABCA1. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin™2000 (2,5 bzw. 5 µL pro Ansatz) mit 50 bzw. 100 nM ABCA1 siRNA oder *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert (Tag 5 und 2 vor Apoptose-Induktion), dann die Zellen frisch ausgesät (2×10^6 pro Probe) und nach Erreichen der Adhärenz Apoptose induziert (10 mJ/cm² UV-Bestrahlung oder 2,5 µM Staurosporin) oder die Zellen unbehandelt gelassen (Kontrolle). Nach 13 h wurden die serumfreien Zellkulturüberstände geerntet (2 mL), über Sephadex G15-Säulen filtriert und mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

(D) ABCA1-Expression nach *knock down*. MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 3.8C an den Tagen 5 und 2 vor dem Ernten mit 50 und 100 nM ABCA1 siRNA bzw. *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert. Mit den Zellen wurde eine Zellfraktionierung (siehe 2.3.5) durchgeführt, die Membranfraktionen über ein 6 - 10 %iges SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (100 µg Protein pro Probe) und eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Expression von ABCA1 wurde mit einem anti-ABCA1-Antikörper nachgewiesen, zur Kontrolle wurde anti-NHE-1-Antikörper verwendet.

(E) ABCA1 mRNA-Expression nach *knock down*. Wie unter 3.8C wurden MCF7_{casp3} Zellen an den Tagen 5 und 2 vor dem Ernten mit 50 und 100 nM ABCA1 siRNA bzw. *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert. Dann wurde die Gesamt-RNA isoliert, 1 µg zur reversen Transkription eingesetzt und mit 80 ng cDNA die mRNA-Expression mittels *real-time* PCR ermittelt. Die Expression der mit spezifischem ABCA1-siRNA-Oligonukleotid behandelten Zellen wurde relativ zur Expression der Kontrollzellen (= 100%) bestimmt.

(F) Apoptoserate nach ABCA1-*knock down*. MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter 3.8C behandelt und 24 h nach Apoptose-Induktion geerntet. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach dem Anfärben der DNA im Zellkern mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch über die Bestimmung der hypodiploiden Nuklei ermittelt.

Abbildung 3.8C zeigt, dass der *knock down* von ABCA1 mit funktionellem siRNA-Oligonukleotid in MCF7_{casp3} Zellen die Freisetzung des Attraktionssignals nach Apoptose-Induktion durch UV-Bestrahlung oder Staurosporin-Stimulation komplett inhibierte. Dagegen hatte die Transfektion mit nicht-funktionellem *Scramble*-Oligonukleotid keinen Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände dieser Zellen. Dieser Effekt konnte durch die 2-fache Transfektion der Zellen mit 50 oder 100 nM siRNA und einer Inkubationszeit von insgesamt 5 Tagen erreicht werden. In Abbildung 3.8D und 3.8E ist die Protein- und die mRNA-Expression von ABCA1 zu dem Zeitpunkt dargestellt, an dem in den Zellen Apoptose induziert wurde. Sowohl mit 50 als auch mit 100 nM ABCA1-siRNA-Oligonukleotid war in der Westernblot-Analyse eine deutlich reduzierte Expression von ABCA1 gegenüber den *Scramble*-behandelten Zellen zu beobachten und nur noch eine schwache Bande des ABCA1-Transporters bei 220 kDa detektierbar. Die Analyse der mRNA-Expression von ABCA1 ergab eine Reduktion um 20 % (mit 50 nM siRNA) bzw. 60 % (100 nM siRNA) und war somit zu diesem Zeitpunkt weniger deutlich inhibiert als die Proteinexpression. Als Ladekontrolle wurde im Westernblot das Membranprotein Natrium-Protonen-Austauscher-1 (NHE-1) nachgewiesen.

Um auszuschließen, dass der *knock down* von ABCA1 oder die Behandlung mit siRNA-Oligonukleotiden allgemein zu einer gehemmten Apoptose führen, wurde die Apoptoserate der entsprechend behandelten Zellen anhand der apoptotischen hypodiploiden Zellkerne bestimmt. Wie in Abbildung 3.8F dargestellt, hatte die Vorbehandlung der Zellen mit ABCA1-siRNA bzw. *Scramble*-Oligonukleotid keinen Einfluss auf die Apoptoserate. Lediglich mit 100 nM *Scramble*-Oligonukleotid war die Apoptoserate der Kontrollzellen etwas erhöht, was sich auch in einer leicht gesteigerten Transmigrationsrate von ca. 7 % widerspiegelte (Abbildung 3.8C).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass dem ABCA1-Transporter eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung des Attraktionssignals LPC während der Apoptose zukommt, wogegen die Expression von ABCA7 wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluss hat.

3.2.6 Überexpression von iPLA₂ und Aktivierung des ABCA1-Transporters führt auch bei vitalen Zellen zur Freisetzung des Attraktionssignals

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen so konnte gezeigt werden, dass iPLA₂ während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert wird (Abschnitt 3.1.1). Das dabei entstehende 26-kDa-Fragment iPLA₂ aa514-733 zeigt eine deutlich höhere Aktivität als das ungespaltene Vollängenprotein (Abschnitt 3.1.2). Zusätzlich scheint oxidativer Stress die Hydrolyse des iPLA₂-Substrats Phosphatidylcholin zu fördern und somit die LPC-Generierung zu unterstützen (Abschnitt 3.2.3). Für die letztendliche Freisetzung von LPC während der Apoptose scheint der ABCA1-Transporter eine entscheidende Rolle zu spielen (Abschnitt 3.2.5). Um diese Hypothesen weiter zu belegen, wurde nun versucht, die apoptotische Situation durch Expression aktiver iPLA₂ und Aktivierung des ABCA1-Transporters in vitalen Zellen zu simulieren. Dazu wurde in MCF7_{casp3} Zellen zuerst die ABCA1-Expression durch Transfektion von ABCA1-siRNA gehemmt bzw. die Zellen mit *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert. Nach 4,5 Tagen wurden die Zellen mit iPLA₂ aa514-733 transfiziert und nach 24 h Inkubationszeit mit Ionomycin C in An- oder Abwesenheit des iPLA₂-Inhibitors BEL oder des cPLA₂-Inhibitors AACOCF₃ stimuliert. Da ABCA1 während der Apoptose durch den Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels aktiviert wird, wurde hier zur Aktivierung von ABCA1 in vitalen Zellen Ionomycin C eingesetzt, ein Calcium-Ionophor, das zum Einstrom von extrazellulärem Calcium und damit zur Erhöhung der cytosolischen Calcium-Konzentration führt. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, führte die Stimulation mit Ionomycin bei den mit *Scramble*-Oligonukleotid behandelten Zellen zur Freisetzung des Attraktionssignals, nach *knock down* von ABCA1 hatte die Ionomycin-Behandlung keinen Effekt. Durch Inhibierung der überexprimierten aktiven iPLA₂ aa514-733 und der endogenen iPLA₂ durch BEL konnte die Freisetzung des Attraktionssignals komplett inhibiert werden. Die Hemmung der endogenen cPLA₂ durch AACOCF₃ hatte dagegen keinen Effekt.

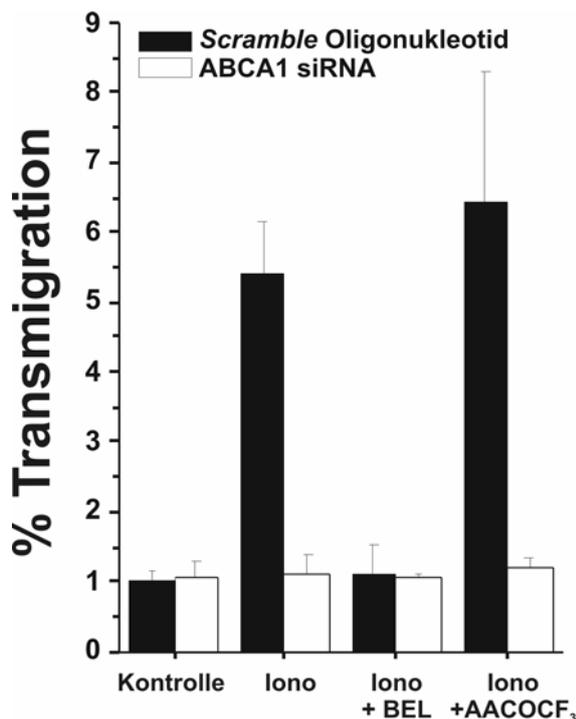


Abbildung 3.9: Aktive iPLA₂ und Aktivierung des ABCA1-Transporters führen zur Freisetzung des Attraktionssignals.

Simulation der apoptotischen Situation in vitalen Zellen. MCF7_{casp3} Zellen wurden mit Hilfe von 5 µL LipofectaminTM2000/Probe mit 100 nM ABCA1 siRNA bzw. *Scramble*-Oligonukleotid transfiziert (Tag 4,5 und 2 vor der weiteren Behandlung). Die Zellen wurden frisch ausgesät (0,5 x 10⁶ Zellen pro Kavität einer 6-well-Platte) und dann mit iPLA₂ aa514-733 (C-FLAG) transfiziert (mit Hilfe von FuGENETM6). Nach 24 h wurden die Zellen in 2 mL serumfreiem Medium mit 4 µM Ionomycin C in An- bzw. Abwesenheit von 20 µM BEL oder 20 µM AACOCF₃ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Überstände wurden nach 1 h geerntet, über Sephadex G15-Säulen filtriert und mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression aktiver iPLA₂ auch in vitalen Zellen zur Generierung des Attraktionssignals LPC führt, dessen Freisetzung kann durch Aktivierung des ABCA1-Transporters mittels Calcium-Influx stimuliert oder durch ABCA1-*knock down* inhibiert werden. Endogene cPLA₂ scheint unter diesen Bedingungen dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf die LPC-Produktion in vitalen Zellen zu haben.

3.3 Die Migration monozytärer Zellen auf das Attraktionssignal LPC wird durch den G2A-Rezeptor vermittelt

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der LPC-Produktion und Freisetzung während der Apoptose genauer untersucht und mit iPLA₂ und ABCA1 die beiden zentralen Mediatoren identifiziert, wie in den Abschnitten 3.1 und 3.2 gezeigt. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Rezeptoren die Wirkung von LPC als löslichem „find-me“-Signal auf den Phagozyten vermitteln und deren Migration auslösen.

3.3.1 Vergleich der monozytären Zelllinien THP-1 und U937

Ursprünglich als „*Orphan*-Rezeptor“ beschrieben, zeigten Kabarowski et al., dass der G-Proteingekoppelte Rezeptor G2A unter anderem Lysophosphatidylcholin binden kann und damit ein transients Anstieg des Calcium-Spiegels der Zellen und die Aktivierung der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAP-Kinase) ausgelöst wird (Kabarowski et al., 2001). In Folgestudien konnte eine G2A-vermittelte Migration von T-Zellen und Makrophagen auf LPC nachgewiesen werden (Radu et al., 2004; Yang et al., 2005). Die 2001 von Kabarowski veröffentlichten Daten mussten zurückgezogen werden, da die direkte Bindung von LPC an den G2A-Rezeptor nicht reproduziert werden konnte (Witte et al., 2005), jedoch wurde ausdrücklich betont, dass eine Beteiligung des G2A-Rezeptors an der LPC-vermittelten Chemotaxis auch in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Somit sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob G2A für die Induktion der Migration von Phagozyten auf apoptotische Überstände verantwortlich ist.

Dazu wurde zuerst das Migrationsverhalten von THP-1 und U937 Zellen verglichen, wobei U937 Zellen bekanntermaßen ein niedriges G2A-Expressionsniveau haben (Yang et al., 2005). In Abbildung 3.10 ist die Migration von THP-1 und U937 Zellen in Transmigrationstests dargestellt, in denen die Überstände vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen bzw. gereinigtes Lysophosphatidylcholin und *Stromal-Cell-derived Factor 1-alpha* (SDF-1 α) (Cherla und Ganju, 2001) als Migrationsstimuli eingesetzt wurden. Dabei wurde deutlich, dass nur THP-1 Zellen auf die Überstände apoptotischer Zellen und gereinigtes LPC wanderten, U937 Zellen zeigten dagegen keine Migration. Um auszuschließen, dass dies möglicherweise an einem generellen Defekt der Migrationsfähigkeit der U937 Zellen lag, wurden als Positivkontrollen die Überstände nekrotischer Zellen und gereinigtes SDF-1 α eingesetzt, worauf sowohl THP-1 als auch U937 Zellen wanderten. Dabei konnte bei den U937 Zellen eine lediglich geringfügig niedrigere Migrationsrate im Vergleich zu THP-1 Zellen festgestellt werden.

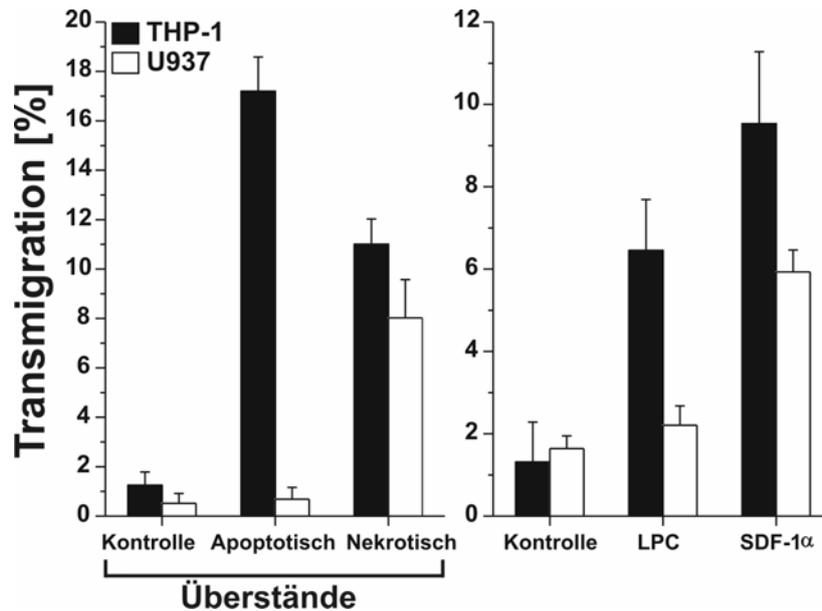


Abbildung 3.10: Monozytäre THP-1 Zellen wandern auf Überstände apoptotischer Zellen und gereinigtes LPC, U937 Zellen nicht.

Migration von THP-1 und U937 Zellen auf Überstände vitaler, apoptotischer oder nekrotischer Zellen und gereinigtes LPC oder SDF-1 α . 2×10^6 MCF7_{casp3} Zellen wurden mit 10 mJ/cm^2 UV-Licht bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen (Kontrolle) und 13 h in 2 mL serumfreiem Medium inkubiert (Überstände vitaler bzw. apoptotischer Zellen) oder in 2 mL serumfreiem Medium für 20 min bei 58°C inkubiert (Überstände nekrotischer Zellen). Die so gewonnenen Überstände wurden in Transmigrationstests mit je 1×10^5 THP-1 oder U937 Zellen eingesetzt. Der Anteil migrierter Zellen wurde nach 2 h Inkubationszeit bestimmt (siehe 2.2.10). Gereinigtes LPC und SDF-1 α wurden in serumfreiem Medium mit 0,1 % fettsäurefreiem BSA gelöst und in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ (LPC) und 200 ng/mL (SDF-1 α) für 3 h zur Transmigration eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

Um das beobachtete Migrationsverhalten von THP-1 und U937 Zellen hinsichtlich der G2A-Abhängigkeit weiter zu untersuchen, wurde die Expressionsstärke von G2A in beiden Zelllinien verglichen. Wie in Abbildung 3.11A zu sehen ist, war die Menge an G2A-mRNA in U937 Zellen um 60 % gegenüber THP-1 Zellen reduziert. Noch deutlicher war dieser Unterschied in der Westernblot-Analyse zu erkennen, bei der in U937 Zellen keine G2A-Bande bei 46 kDa detektierbar war (Abbildung 3.11B). Die mit Sternchen gekennzeichneten Banden der U937-Probe bezeichnen unspezifische Signale des G2A-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente das Membranprotein Natrium-Protonen-Austauscher-1 (NHE-1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass G2A ein möglicher Kandidat für die LPC-vermittelte Anlockung von Phagozyten sein könnte.

Neben G2A könnte auch der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GRP4 eine Rolle spielen, da dieser im Zusammenhang mit der LPC-vermittelte Migration von Swiss 3T3 Zellen (murine Fibroblasten) beschrieben wurde (Zhu et al., 2001). Diese Veröffentlichung wurde 2005 ohne nähere Erläuterungen zurückgezogen (2005), jedoch sollte eine mögliche Beteiligung von GPR4 hier nicht außer Acht gelassen werden. Der Vergleich der mRNA-Expression von G2A und GPR4 zeigte, dass die G2A-Expression in THP-1 Zellen etwa fünfmal höher war als die Expression von GPR4-mRNA (Abbildung 3.11C). Deshalb wurde zunächst die Rolle von G2A bei der LPC-vermittelten Migration von Monozyten untersucht.

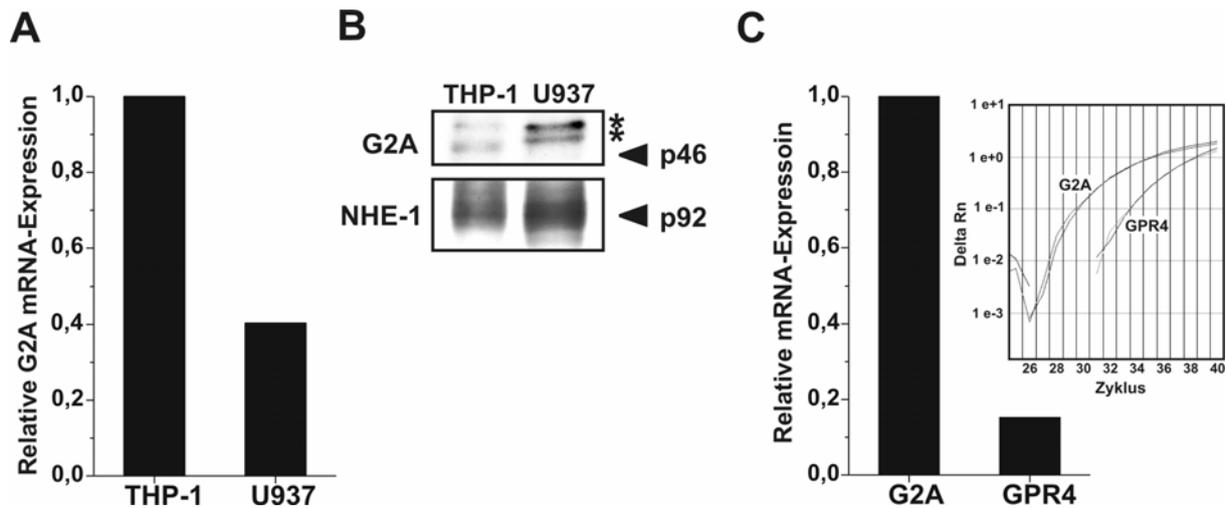


Abbildung 3.11: Expressionsstärke putativer LPC-Rezeptoren in THP-1 und U937 Zellen.

(A) G2A-mRNA-Expression in THP-1 und U937 Zellen. Es wurde aus 2×10^6 THP-1 bzw. U937 Zellen die mRNA isoliert und je $1 \mu\text{g}$ revers transkribiert. 80 ng der so gewonnenen cDNA wurden zur quantitativen *real time*-PCR eingesetzt, auf die Expression der ALAS-1 mRNA normalisiert und relativ zur G2A-mRNA-Expression der THP-1 Zellen quantifiziert.

(B) G2A-Expression in Membranfraktionen von THP-1 und U937 Zellen. Wie unter 2.3.5 beschrieben, wurde mit 1×10^7 THP-1 und U937 Zellen eine Zellfraktionierung durchgeführt und je $130 \mu\text{g}$ der so gewonnenen Membranproteine über ein 8 - 15 %iges SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit einem anti-G2A-Antikörper, als Ladekontrolle wurde die Expression von NHE-1 detektiert.

(C) Expression von G2A- und GPR4-mRNA in THP-1 Zellen. Aus 2×10^6 THP-1 Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und $80 \mu\text{g}$ der cDNA zur quantitativen *real time*-PCR eingesetzt. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels der $(1+E)^{-CT}$ -Methode unter Berücksichtigung der jeweiligen Amplifikationseffizienz. Rechts ist die primäre Amplifikationskurve dargestellt.

3.3.2 Für die Migration von THP-1 Zellen auf das Attraktionssignal LPC ist G2A verantwortlich, nicht GPR4

Um die Abhängigkeit der Lysophosphatidylcholin-vermittelten Migration von Phagozyten von der G2A-Expression und eine mögliche Beteiligung von GPR4 weiter zu untersuchen, sollte nun die Expression dieser Rezeptoren durch die Behandlung mit siRNA in THP-1 Zellen reduziert werden. Wie in Abbildung 3.12A dargestellt, führte der *knock down* von G2A mit zwei unterschiedlichen G2A-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (nt280 und nt550) zu einer deutlich reduzierten Migration der THP-1 Monozyten auf die Überstände apoptotischer Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-Oligonukleotid behandelten THP-1 Zellen. Mit gereinigtem LPC als Stimulus konnte die Migration der Monozyten durch die Behandlung mit G2A-siRNA sogar völlig inhibiert werden (Abbildung 3.12B). Um auszuschließen, dass die Transfektion mit siRNA an sich einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen hatte, wurden als Positivkontrollen Überstände nekrotischer Zellen und gereinigtes SDF-1 α eingesetzt. Wie in Abbildung 3.12A und 3.12B zu sehen ist, wanderten die mit spezifischen G2A-siRNA-Oligonukleotiden behandelten Zellen ebenso auf die Überstände nekrotischer Zellen und SDF-1 α wie die mit *Scramble*-Oligonukleotid transfizierten Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass G2A tatsächlich eine Rolle bei der durch LPC und apoptotische Überstände vermittelten Migration von Phagozyten spielt.

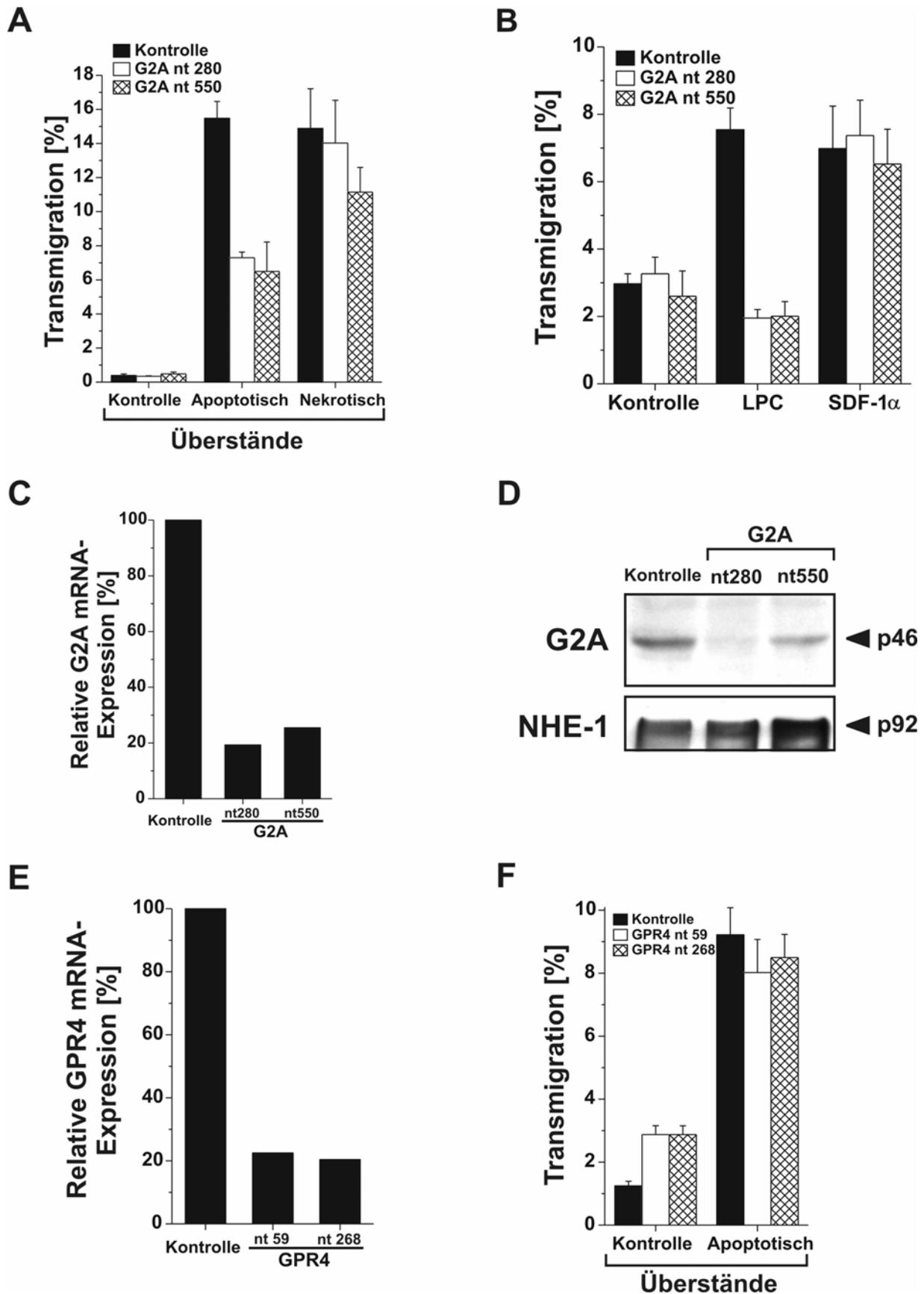


Abbildung 3.12: Der *knock down* von G2A in THP-1 Zellen führt zu einer verminderten Migration auf Überstände apoptotischer Zellen und gereinigtes LPC, der *knock down* von GPR4 scheint keinen Einfluss zu haben.

(A) Migration auf Überstände vitaler, apoptotischer oder nekrotischer Zellen nach G2A-knock down in THP-1 Zellen. Die Überstände von je 2×10^6 MCF7_{casp3} Zellen wurden wie unter Abbildung 3.10 beschrieben vorbereitet. Der G2A-knock down in THP-1 Zellen erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben durch zweimalige Elektroporation mit zwei G2A-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden bzw. einem unspezifischen Kontroll-Oligonukleotid (*Scramble*). Die Transmigrationstests wurden an Tag 6 nach der ersten Elektroporation durchgeführt und für 2 h inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

(B) Einfluss des G2A-knock down auf die Migration auf gereinigtes LPC und SDF-1. 10 μ M LPC oder 200 ng/mL SDF-1 α wurden in serumfreiem Medium + 0,1 % fettsäurefreiem BSA zur Transmigration mit THP-1 Zellen nach G2A-knock down (wie unter 3.12A) eingesetzt. Die Transmigrationstests wurden für 3 h inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

(C) G2A-mRNA-Expression nach knock down. Der G2A-knock down in THP-1 Zellen erfolgte wie unter 3.12A durch zweimalige Elektroporation mit zwei G2A-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden bzw. einem unspezifischen *Scramble*-Oligonukleotid. 6 Tage nach der ersten Elektroporation wurde die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und 80 ng der cDNA zur quantitativen *real time*-PCR eingesetzt. Die Proben wurden auf die ALAS-1-mRNA-Expression normalisiert und die G2A-Expression der *Scramble*-behandelten Zellen als 100 % gesetzt.

(D) G2A-Expression in Membranfraktionen nach knock down. 6 Tage nach der ersten Elektroporation mit zwei spezifischen G2A-siRNA-Oligonukleotiden bzw. *Scramble*-Oligonukleotid wurde mit je 1×10^7 THP-1 Zellen eine Zellfraktionierung durchgeführt (siehe 2.3.5). 100 μ g der so gewonnenen Membranproteine wurden in einer SDS-PAGE (8 - 15 %) elektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mittels anti-G2A-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle diente NHE-1

(E) GPR4-mRNA-Expression nach knock down mit siRNA-Oligonukleotiden. Nach zweimaliger Elektroporation von THP-1 Zellen mit zwei spezifischen GPR4-siRNA-Oligonukleotiden bzw. *Scramble*-Oligonukleotid wurden die Zellen an Tag 6 nach der ersten Elektroporation geerntet und wie unter 3.12C die mRNA-Expression von GPR4 bestimmt.

(F) Einfluss des GPR4-knock down auf die Migration von THP-1 Zellen auf Überstände vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen. Wie unter 3.12A wurde mit THP-1 Zellen, die 2x mit zwei spezifischen GPR4-siRNA-Oligonukleotiden bzw. Kontroll-Oligonukleotid elektroporiert worden waren, an Tag 6 Transmigrationstests durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

In Abbildung 3.12C ist die G2A-mRNA-Expression nach dem *knock down* in THP-1 Zellen dargestellt. Durch die beiden spezifischen siRNAs konnte eine Reduktion auf etwa 20 % der ursprünglichen mRNA-Menge erreicht werden. Auch in der Westernblot-Analyse war der Erfolg der siRNA-Behandlung deutlich zu sehen und die G2A-Bande bei 46 kDa gegenüber der Kontrolle stark reduziert und nur noch schwach nachweisbar (Abbildung 3.12D). Diese schwache, aber immer noch detektierbare Expression von G2A könnte auch die reduzierte, jedoch nicht völlig inhibierte Migration der THP-1 Zellen auf apoptotische Überstände erklären (Abbildung 3.12A). Eine andere Möglichkeit wäre die Beteiligung weiterer Rezeptoren, wie GPR4, was ebenfalls durch den *knock down* dieses Rezeptors in THP-1 Zellen geklärt werden sollte. Wie in Abbildung 3.12E zu sehen, führte der *knock down* von GPR4 mit zwei spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (nt59 und nt268) zwar zu einer starken Reduktion der GPR4-mRNA (vergleichbar mit dem G2A *knock down*), aber nicht zu einer reduzierten Migration dieser THP-1 Zellen gegenüber den mit Kontroll-Oligonukleotid behandelten Zellen (Abbildung 3.12F). Somit scheint die Expression von G2A wichtig zu sein für die durch apoptotische Überstände und gereinigtes LPC ausgelöste Migration von Phagozyten. GPR4 dagegen spielt bei diesem Prozess wahrscheinlich keine wesentliche Rolle.

3.3.3 G2A-exprimierende U937 Zellen wandern auf apoptotische Überstände und gereinigtes Lysophosphatidylcholin

Wie in Abschnitt 3.3.2 dargestellt, scheint die Expression von G2A eine wichtige Rolle bei der Migration von Phagozyten auf apoptotische Attraktionssignale und gereinigtes Lysophosphatidylcholin zu spielen. Ob G2A jedoch alleine ausreichend ist, um diese Reaktion in monozytären Zellen hervorzurufen, ist damit nicht klar. Um diese Frage zu beantworten, wurden U937 Zellen verwendet, die stabil mit einem retroviralen Expressionskonstrukt für G2A (U937_{G2A}) bzw. dem Leervektor (U937_{vektor}) transfiziert worden waren (Yang et al., 2005). Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, wanderten G2A-exprimierende U937_{G2A} Zellen schwach auf apoptotische Überstände und stärker auf gereinigtes

LPC, U937_{vektor} Zellen dagegen zeigten keine Reaktion. Dass auch diese Zellen generell die Fähigkeit zur aktiven Migration besitzen, konnte durch die Positivkontrolle in Form von gereinigtem SDF-1 α gezeigt werden, worauf U937_{vektor} und U937_{G2A} Zellen gleichermaßen wanderten. Damit konnte bestätigt werden, dass die Expression von G2A in den monozytären Zellen THP-1 und U937 äußerst wichtig ist für die Migration dieser Zellen auf apoptotische Attraktionssignale sowie gereinigtes Lysophosphatidylcholin.

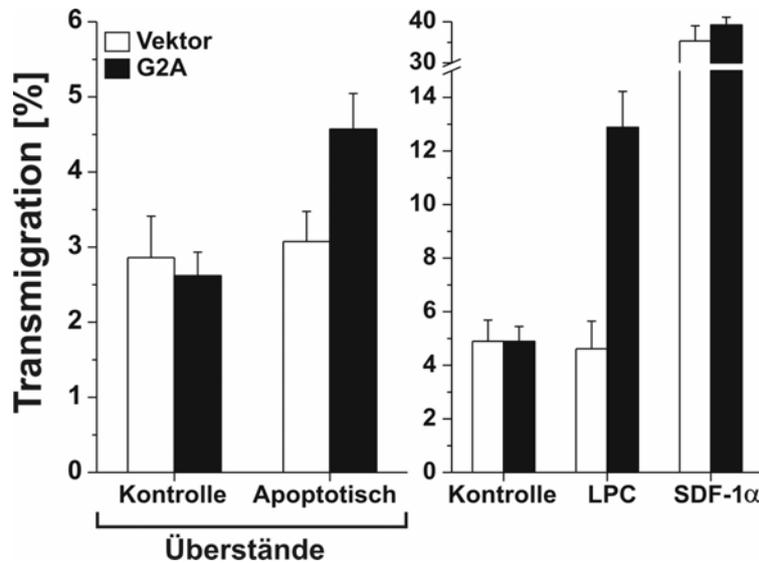


Abbildung 3.13: Durch die Expression von G2A wandern U937 Zellen auf Überstände apoptotischer Zellen und gereinigtes LPC.

Wie unter Abbildung 3.10 beschrieben, wurden die Überstände von 2×10^6 vitalen oder apoptotischen MCF7_{casp3} Zellen bzw. 10 μ M LPC oder 200 ng/mL SDF-1 α in den Transmigrationstests eingesetzt. Diese wurden mit G2A-exprimierenden U937_{G2A} Zellen bzw. mit Leervektor-transfizierten U937_{vektor} Zellen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

3.4 Rolle von Annexin I bei der Eliminierung apoptotischer Zellen

Annexin I ist bereits seit langem als Glucocorticoid-induzierbares anti-inflammatorisches Protein bekannt und kann unter anderem die Extravasation von Monozyten und Neutrophilen in entzündete Gewebe inhibieren (Perretti et al., 2002; Solito et al., 2000) und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als wichtiger Faktor bei der Eliminierung apoptotischer Zellen beschrieben (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004; Maderna et al., 2005). Außerdem wurde Annexin I als Inhibitor der Calcium-abhängigen Phospholipase A₂ (cPLA₂) identifiziert (Frey et al., 1999; Kim et al., 2001; Solito et al., 1998), wodurch die Freisetzung von Arachidonsäure und damit die Synthese von potentiell pro-inflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen vermindert wird (Wu et al., 2000b). Aufgrund der Funktion von Annexin I als cPLA₂-Inhibitor und der Tatsache, dass die Calcium-unabhängige PLA₂ (iPLA₂) als Vollängenprotein eine wesentlich geringere Aktivität zeigte als nach Caspase-3-Prozessierung (Abschnitt 3.1.2) war es denkbar, dass Annexin I auch mit iPLA₂ assoziiert sein könnte und so möglicherweise deren Aktivität in vitalen und apoptotischen Zellen beeinflusst. Durch die Prozessierung der iPLA₂ während der Apoptose könnte Annexin I abgespalten und somit die inhibitorische Wirkung aufgehoben werden. Zusätzlich könnte die in der Literatur beschriebene Annexin-I-Externalisierung zur räumlichen Trennung von iPLA₂ und Annexin I führen und auch

dadurch Einfluss auf die Aktivierung von iPLA₂ und die Freisetzung des Attraktionssignals LPC haben. Somit könnte Annexin I sowohl bei der Freisetzung von „find-me“-Signalen als auch bei der Erkennung von „eat-me“-Signalen eine entscheidende Rolle spielen.

Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob Annexin I mit iPLA₂ interagiert und die Annexin-I-Expression einen Einfluss auf die iPLA₂-vermittelte Produktion von apoptotischen Attraktionssignalen hat.

3.4.1 Annexin I hat keinen Einfluss auf die Freisetzung apoptotischer Attraktionssignale

Eine mögliche Interaktion von Annexin I mit iPLA₂ sollte durch Ko-Immunpräzipitationen aufgeklärt werden. Dazu wurden die FLAG-getaggtten iPLA₂-Formen aa1-806 (86 kDa Volllängenprotein), aa514-806 (p32) und aa514-733 (p26, finales Caspase-3-Spaltfragment) in MDA-MB 231 Zellen überexprimiert. Diese Zelllinie wurde verwendet, da sie in Vorversuchen im Vergleich zu anderen Zellen eine starke endogene Annexin-I-Expression aufwies (Daten nicht gezeigt). Aus den so vorbereiteten Zellen wurden die iPLA₂-Konstrukte über das FLAG-Tag präzipitiert, wobei jeder Präzipitationsansatz entweder mit 5 mM Calciumchlorid oder 5 mM EGTA durchgeführt wurde, um eine mögliche Calcium-Abhängigkeit der Bindung zwischen Annexin I und iPLA₂ zu zeigen. Die Westernblot-Analyse der eluierten Proteine mit dem anti-Annexin-I-Antikörper zeigte, dass in keinem Fall eine Ko-Präzipitation von Annexin I an iPLA₂ stattgefunden hatte, obwohl in den eingesetzten Zelllysaten (Input) große Mengen an Annexin I nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.14A). Die Präzipitation der FLAG-iPLA₂-Konstrukte an anti-FLAG-Agarose war bei allen Proben erfolgreich und wurde im Westernblot mit anti-FLAG-Antikörper bestätigt (Abbildung 3.14B).

Obwohl eine direkte Interaktion von Annexin I mit iPLA₂ hier nicht nachweisbar war, könnte Annexin I trotzdem eine indirekte regulatorische Wirkung auf die iPLA₂ und damit auf die Generierung löslicher Attraktionssignale während der Apoptose haben. Um dies zu untersuchen, wurde in MCF7_{casp3} Zellen, die bekanntermaßen apoptotische Attraktionssignale freisetzen, die Annexin-I-Expression durch Stimulation mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induziert und danach Apoptose ausgelöst. In Abbildung 3.14C ist die nach PMA-Behandlung deutlich erhöhte Expression von Annexin I im Vergleich zur relativ niedrigen basalen Annexin-I-Expression dargestellt. Als Kontrolle wurde iPLA₂ detektiert. Diese höhere Annexin-I-Menge hatte jedoch keinen Einfluss auf die Freisetzung von „find-me“-Signalen nach UV-Bestrahlung (Abbildung 3.14D).

Um einen möglichen Einfluss von Annexin I differenzierter zu betrachten und mögliche Nebeneffekte der PMA-Behandlung auszuschließen, wurden MCF7_{casp3} Zellen mit verschiedenen EGFP-getaggtten Annexin-I-Konstrukten transfiziert und danach UV-bestrahlt. Die Expression der unterschiedlichen Annexin-I-Formen mit und ohne Apoptose-Induktion ist in Abbildung 3.14E dargestellt (Struktur von Annexin I: siehe Abbildung 1.6). Alle Konstrukte wurden deutlich exprimiert und zum Teil nach Apoptose-Induktion stark abgebaut. Jedoch hatte keine der überexprimierten Annexin-I-Formen einen Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände nach UV-Bestrahlung und somit auf die Migration der eingesetzten THP-1 Monozyten (Abbildung 3.14F). Lediglich die Expression von Anxl aa1-47 (N-Terminus ohne Annexin-Boxen) und aa1-111 (N-Terminus und Annexin-Box I) schien in vitalen Kontrollzellen zu einer mäßigen Freisetzung von chemotaktisch aktivem Attraktionssignal zu

führen. Die Transfektion mit den unterschiedlichen EGFP-Anxl-Konstrukten selbst hatte dabei keinen Einfluss auf die Apoptose (Daten nicht gezeigt).

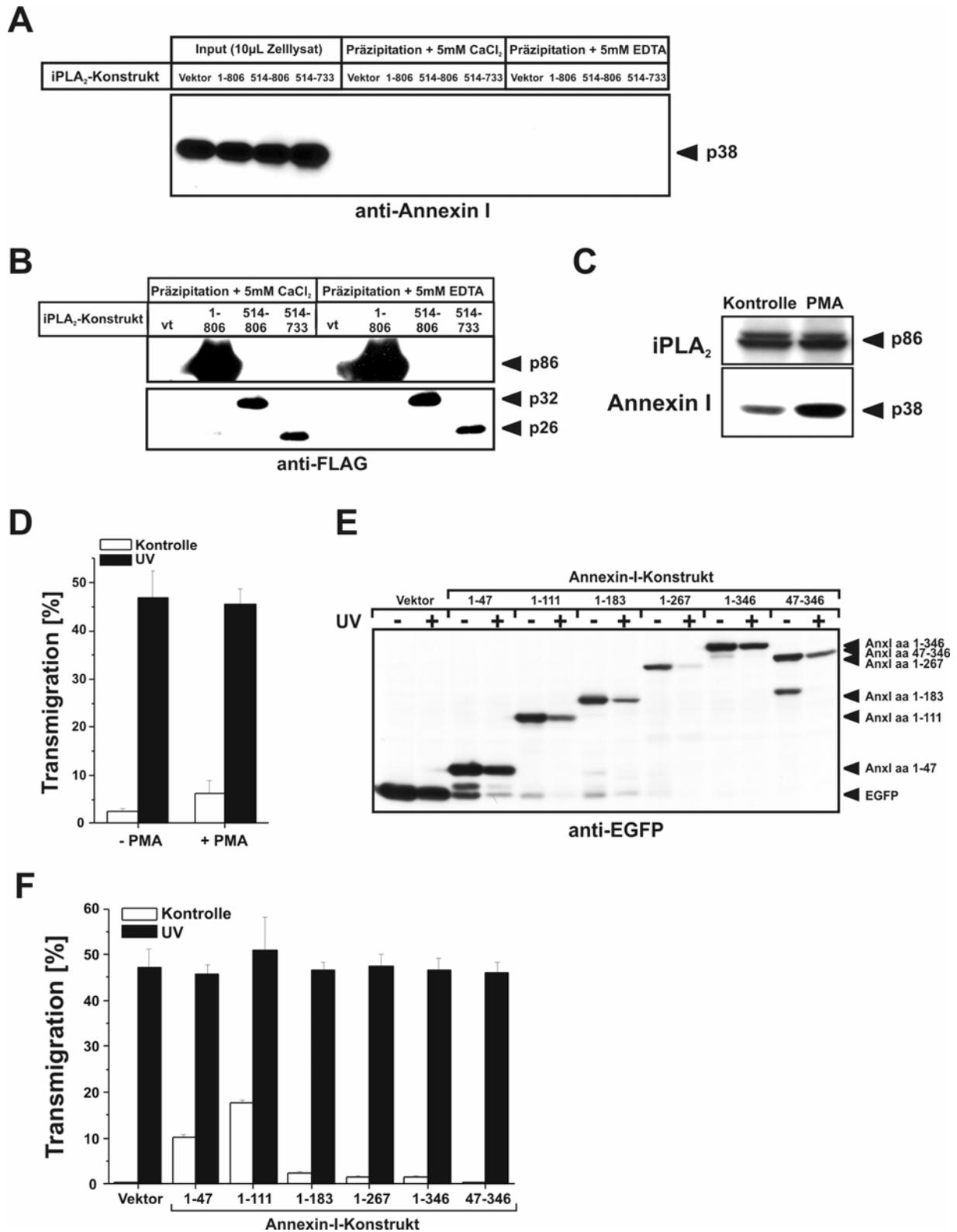


Abbildung 3.14: Die Annexin-I-Expression hat keinen Einfluss auf die Produktion von Attraktionssignalen während der Apoptose

(A) Ko-Immünpräzipitation von Annexin I und iPLA₂. MDA-MB 231 Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin™2000 wie unter 2.2.3 beschrieben mit den iPLA₂-Konstrukten iPLA₂ aa1-806 (N-FLAG), iPLA₂ aa514-806 und iPLA₂ aa514-733 (beide C-

FLAG) bzw. dem Leervektor transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 mL Lysepuffer lysiert und je 500 μ L Lysat mit 5 mM CaCl_2 oder 5 mM EDTA für 1,5 h mit anti-FLAG-Agarose inkubiert. Nach der Elution (siehe 2.3.6) wurden die Proben über ein 6 - 15 %iges SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mit einem anti-Annexin-I-Antikörper analysiert.

(B) Nachweis der präzipitierten FLAG-iPLA₂-Konstrukte an anti-FLAG-Agarose. Zur Präzipitationskontrolle wurde aus den Präzipitationen von 3.14A jeweils ein Teil der Eluate über ein weiteres 6 - 15 %iges SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und in einer Westernblot-Analyse mit einem anti-FLAG-Antikörper getestet.

(C) Annexin-I-Expression nach PMA-Behandlung. MCF7_{casp3} Zellen wurden für 18 h mit 80 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt bzw. ohne PMA kultiviert (Kontrolle). Die Zellen wurden lysiert und 150 μ g Protein pro Probe in einer SDS-PAGE (6 - 15 %) aufgetrennt. Die Analyse der Annexin-I-Expression erfolgte im Westernblot mit anti-Annexin-I-Antikörper, zur Kontrolle wurde die iPLA₂-Expression mit einem anti-iPLA₂-Antikörper bestimmt.

(D) Transmigration nach Annexin-I-Induktion durch PMA. Jeweils 1×10^6 MCF7_{casp3} Zellen wurden für 18 h mit 80 nM PMA stimuliert bzw. unbehandelt gelassen. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und in 2 mL serumfreiem Medium für 13 h inkubiert. Die Kontrollen wurden ebenfalls mit PBS gewaschen und 13 h in serumfreiem Medium inkubiert. Mit den zellfreien Überständen wurde wie unter 2.2.10 beschrieben mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

(E) Überexpression verschiedener Annexin-I-Konstrukte in MCF7_{casp3} Zellen. Je 3×10^5 MCF7_{casp3} Zellen wurden mit Hilfe von FuGENETM6 mit den Annexin-I-Konstrukten aa1-47, aa1-111, aa1-183, aa1-267, aa1-346, aa47-346 (alle C-terminal EGFP-getaggt) oder dem Leervektor transfiziert und für 18 h inkubiert. Danach wurde mit 10 mJ/cm² UV-Bestrahlung Apoptose induziert bzw. die Zellen unbehandelt gelassen und für weitere 13 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und über ein 8 - 15 %iges SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit einem anti-EGFP-Antikörper.

(F) Transmigration nach Überexpression verschiedener Annexin-I-Formen. Wie unter 3.14E wurden MCF7_{casp3} Zellen mit verschiedenen EGFP-Annexin-I-Konstrukten transfiziert und die Zellen nach 18 h mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt bzw. unbehandelt gelassen (Kontrolle) und in 2 mL serumfreiem Medium für weitere 13 h inkubiert. Mit den zellfreien Überständen wurde mit THP-1 Monozyten ein Transmigrationstest durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten.

3.4.2 Annexin I wird von spät-apoptotischen Jurkat Zellen externalisiert, unabhängig vom verwendeten Stimulus

Nachdem Annexin I keine Rolle bei der iPLA₂-vermittelten Generierung apoptotischer Attraktionssignale zu spielen scheint, wurde als Nächstes näher auf die Funktion von Annexin I während der Phagozytose apoptotischer Zellen eingegangen. Dazu sollte zuerst die von Arur et al. und Fan et al. beobachtete Externalisierung von Annexin I in apoptotischen Jurkat Zellen näher charakterisiert werden (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004).

Dazu wurde in Jurkat Zellen mit dem Breitband-Kinase-Inhibitor Staurosporin Apoptose induziert und die Annexin-I-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 3.15A sind die Primärdaten des zeitlichen Verlaufs der Annexin-I-Externalisierung dargestellt. Durch Doppelfärbung der Zellen mit anti-Annexin-I-Antikörper und Propidiumiodid (PI) wurden sowohl Annexin-I-exponierende als auch sekundär nekrotische Zellen sichtbar gemacht. Nach 6 Stunden war eine deutliche Annexin-I-Färbung auf der Oberfläche nicht permeabilisierter Zellen erkennbar, nach 12 h waren etwa 70 % der Zellen Annexin-I-positiv, wobei über den gesamten zeitlichen Verlauf die Annexin-I-Oberflächenexpression vor allem in PI-positiven Zellen nachweisbar war. Um zu kontrollieren, ob der verwendete anti-Annexin-I-Antikörper möglicherweise unspezifisch an apoptotische Jurkat Zellen bindet, wurde ein IgG₁-Isotyp Kontroll-Antikörper verwendet. Wie in Abbildung 3.15A zu sehen ist, war der Großteil der Zellen nach 12 h Staurosporin-Behandlung zwar PI-positiv, es erfolgte jedoch keine Bindung des Kontroll-Antikörpers. Abbildung 3.15B zeigt die Histogramm-Darstellung der Annexin-I- und IgG₁-Oberflächenfärbung 12 h nach Apoptose-Induktion, in 3.15C ist der Anteil Annexin-I-positiver Zellen und IgG₁-Isotyp-gefärbter Zellen für vitale und apoptotische Jurkat Zellen quantitativ dargestellt.

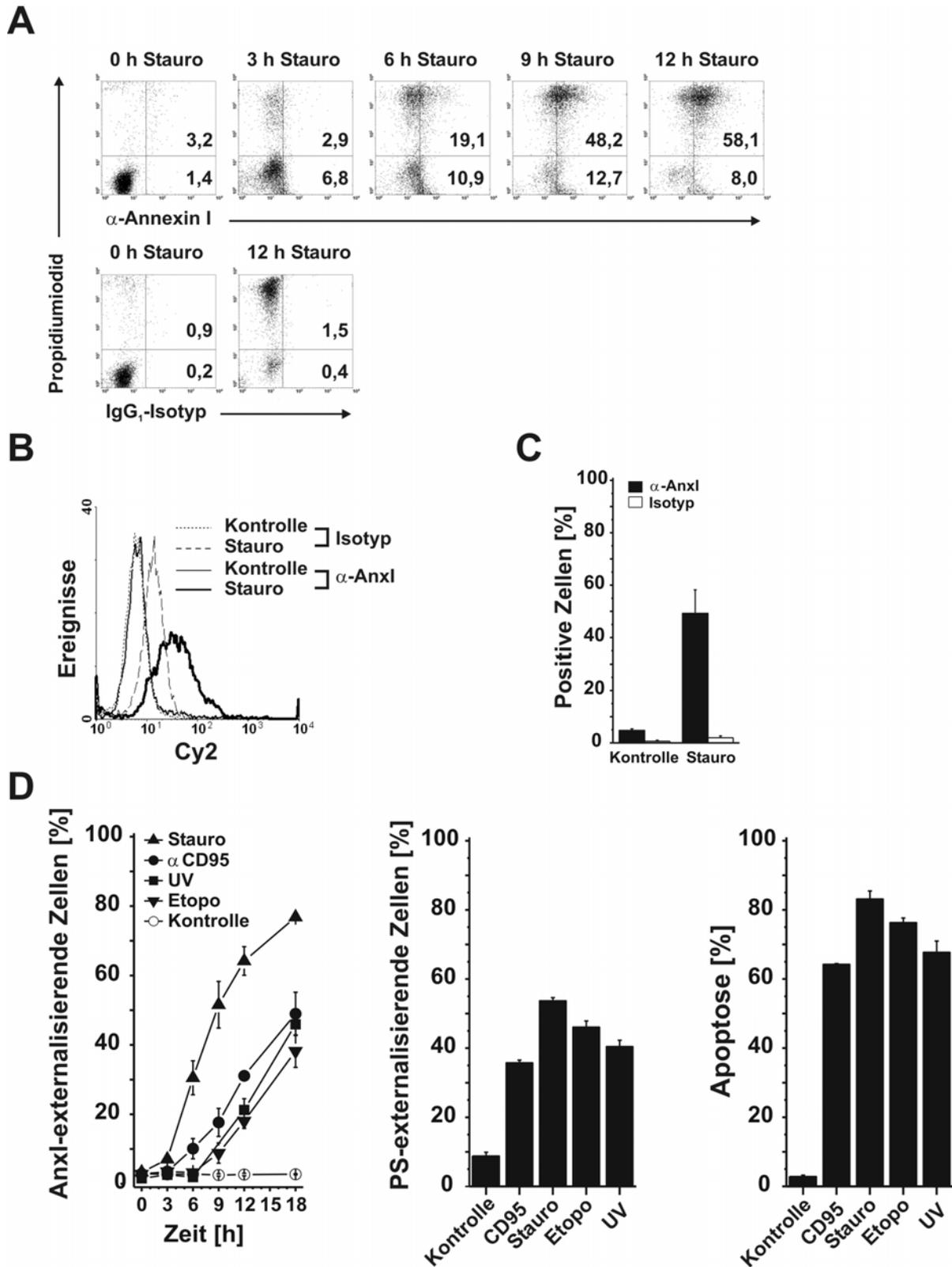


Abbildung 3.15: Annexin-I-Externalisierung in apoptotischen Jurkat Zellen

(A) Durchflusszytometrische Messung von Annexin I an der Zelloberfläche von Jurkat-Zellen. 1×10^5 Jurkat-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in $150 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium in An- oder Abwesenheit von $2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem anti-Annexin-I-Antikörper bzw. dem IgG₁-Isotyp-Kontrollantikörper und anti-Maus-Cy2TM-Antikörper sowie Propidiumiodid doppelgefärbt. Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots aus Triplikaten, wobei auf der x-Achse die Cy2TM- (F1) und auf der y-Achse die Propidiumiodid-Färbung (F2) aufgetragen sind.

(B) Histogramm-Darstellung der 12 h Werte. Dargestellt sind 12 h Werte von wie in A behandelten Zellen, wobei jeweils die gesamte Zellpopulation erfasst ist.

(C) Quantitativer Vergleich zwischen Annexin-I-Färbung und Isotyp-Kontrolle. Gezeigt ist der prozentuale Anteil Annexin-I- bzw. Isotyp-positiver Zellen nach 12 h Inkubation \pm 2,5 μ M Staurosporin. Er ist als Mittelwert mit Standardabweichung aus Triplikaten angegeben.

(D) Annexin-I-Externalisierung, DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserin (PS)-Externalisierung bei Verwendung verschiedener Apoptose-Stimuli. Im linken Schaubild ist der prozentuale Anteil Annexin-I-positiver Zellen als Mittelwert mit Standardabweichung aus Triplikaten dargestellt. 1×10^5 Jurkat-Zellen wurden für 0 - 18 h in 150 μ l Zellkulturmedium mit 100 ng/mL α CD95, 2,5 μ M Staurosporin oder 25 μ g/mL Etoposid inkubiert oder mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und 0 - 18 h lang in serumhaltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-Annexin-I- und anti-Maus-Cy2TM-Antikörper sowie Propidiumiodid doppelgefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Im mittleren und rechten Schaubild ist die Bestimmung der Phosphatidylserin-externalisierenden Zellen nach 6 h Stimulation bzw. der Anteil der hypodiploiden Nuklei nach 24 h als Maß für die Apoptose dargestellt.

Um zu überprüfen, ob die Annexin-I-Externalisierung ein generelles apoptotisches Phänomen und damit vom Stimulus unabhängig ist, wurden weitere Apoptose-Stimuli getestet. In Abbildung 3.15D ist links der zeitliche Verlauf der Annexin-I-Exposition in Jurkat Zellen nach Behandlung mit Staurosporin, anti-CD95-Antikörper, Etoposid oder UV-Bestrahlung bzw. nicht behandelte Zellen gezeigt. Mit allen verwendeten Stimuli konnte eine deutliche Annexin-I-Externalisierung beobachtet werden. Diese war mit den verschiedenen Stimuli unterschiedlich stark und auch der zeitliche Verlauf der Externalisierung war unterschiedlich. Nach Staurosporin-Behandlung war die Annexin-I-Externalisierung am stärksten und am frühesten detektierbar. Im mittleren Teil der Abbildung ist die Phosphatidylserin-Externalisierung als wichtiger Apoptose-Marker 6 h nach Apoptose-Induktion dargestellt. Dabei wurde im Vergleich mit der Annexin-I-Oberflächenfärbung deutlich, dass zu diesem Zeitpunkt unabhängig vom verwendeten Apoptose-Stimulus etwa 40 - 50 % der Jurkat Zellen Phosphatidylserin (PS) externalisiert hatten, jedoch nach 6 h lediglich mit Staurosporin eine mäßige Annexin-I-Externalisierung nachweisbar war. Als weiterer Apoptose-Marker und zur Kontrolle, dass tatsächlich mit allen verwendeten Stimuli Apoptose ausgelöst werden konnte, wurde die DNA-Fragmentierung gemessen (rechtes Schaubild), die nach 24 h mit allen Stimuli sehr deutlich war. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Annexin-I-Externalisierung apoptotischer Jurkat Zellen ein spätes apoptotisches Ereignis ist und vor allem in PI-positiven Zellen stattfindet, zudem scheint dieser Prozess unabhängig vom verwendeten Apoptose-Stimulus zu sein.

3.4.3 Die Externalisierung ist keine generelle Eigenschaft von Proteinen der Annexin-Familie

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Annexin-I-Externalisierung spezifisch ist oder weitere Annexine betrifft, wurden die Zellen gegen Annexin II und Annexin VII getestet. Zusätzlich wurden die apoptotischen Jurkat Zellen zur Kontrolle mit anti-Vinculin-Antikörper inkubiert. 12 h nach Apoptose-Induktion mit anti-CD95-Antikörper oder Etoposid konnte auf etwa 20 % der Zellen eine Oberflächen-Exposition von Annexin I nachgewiesen werden, mit Staurosporin als Apoptose-Stimulus erfolgte auf ca. 60 % der Jurkat Zellen eine Annexin-I-Oberflächenfärbung. Annexin II und Annexin VII waren nicht auf der Oberfläche apoptotischer Jurkat Zellen detektierbar (Abbildung 3.16A). Mit einem anti-Vinculin-Antikörper erfolgte keine Färbung. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der Annexin-I-Nachweis durch Eindringen von Antikörpern in die bereits PI-positiven Zellen und damit durch eine Färbung von intrazellulärem Protein zustande kam.

Um nachzuweisen, dass die hier untersuchten Proteine in Jurkat Zellen exprimiert werden, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass Annexin I offensichtlich während der Apoptose prozessiert wurde und neben dem p38 Vollängen-Protein eine deutliche Bande bei ca. 35 kDa

auftauchte (Abbildung 3.16B). Auch Annexin II und Vinculin wurden exprimiert und nach Staurosporin-Behandlung prozessiert bzw. abgebaut. Für Annexin VII konnte mit dem verwendeten Antikörper zwar keine Prozessierung während der Apoptose, aber eine deutliche Expression beobachtet werden.

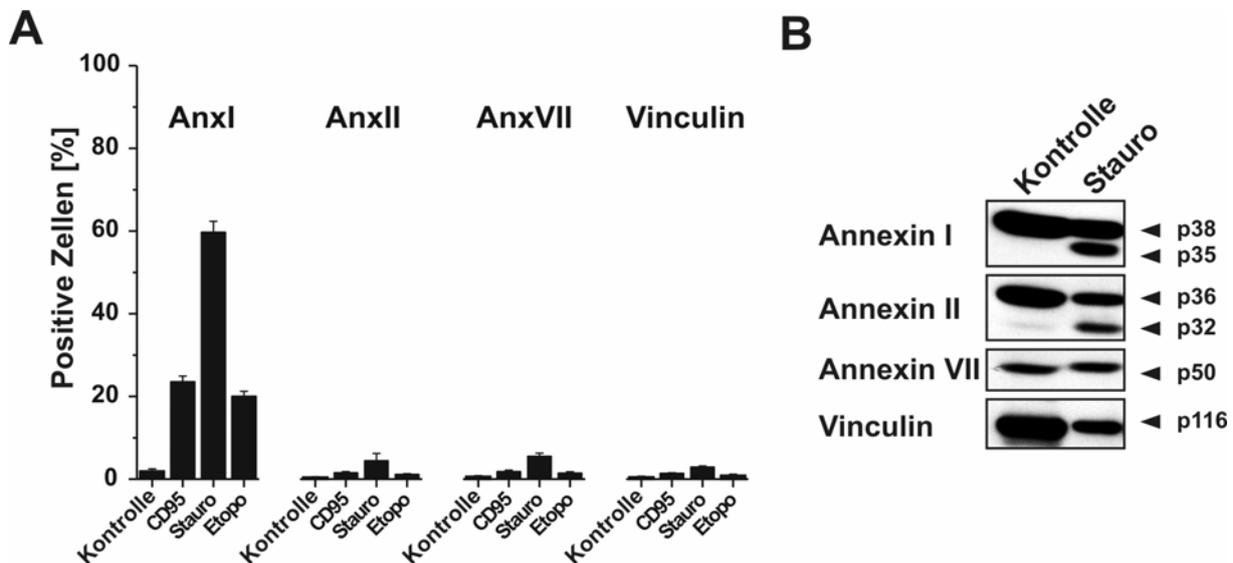


Abbildung 3.16: Die Protein-Externalisierung spät-apoptotischer Jurkat Zellen ist kein generelles Phänomen innerhalb der Annexin-Familie

(A) Verschiedene Apoptose-Stimuli induzieren die Annexin-I-Externalisierung, Annexin II und VII werden nicht externalisiert. Jurkat Zellen wurden wie in 3.15D behandelt und nach 12 h Inkubation gegen Annexin I, Annexin II, Annexin VII oder als extrazelluläre Färbekontrolle gegen Vinculin gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil positiver Zellen als Mittelwert mit Standardabweichung aus Triplikaten.

(B) Western-Blot-Analyse der Proteinexpression. 1×10^6 Jurkat-Zellen wurden für 12 h in 1,5 mL Zellkulturmedium \pm 2,5 μ M Staurosporin inkubiert, anschließend lysiert, in einer SDS-PAGE (8 - 15 %) elektrophoretisch aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse mit anti-Annexin-I-, anti-Annexin-II-, anti-Annexin-VII- und anti-Vinculin-Antikörper unterzogen.

3.4.4 Die Annexin-I-Externalisierung ist Zelltyp-abhängig und geht mit einer Spaltung von Annexin I einher

Nachdem aus den bisherigen Ergebnissen geschlossen werden konnte, dass die in Jurkat Zellen beobachtete Externalisierung von Annexin I unabhängig vom Apoptose-Stimulus ist und keine generelle Eigenschaft von Proteinen der Annexin-Familie, sollten weitere Zelllinien auf dieses Phänomen hin untersucht werden. In Abbildung 3.17A ist der Anteil der Annexin-I-externalisierenden Zellen bzw. der mit IgG₁-Isotyp Kontroll-Antikörper gefärbten Zellen ohne und mit Apoptose-Induktion dargestellt. Obwohl in allen Zelllinien erfolgreich Apoptose induziert werden konnte (Abbildung 3.17B), wurde eine Annexin-I-Externalisierung lediglich in den verwandten T-lymphozytären Zelllinien Molt4 und Jurkat sowie in primären PHA-Blasten (vitale T-Lymphozyten) nachgewiesen. Die Zellen der akut-myeloischen Leukämie-Zelllinien HL60 und THP-1, sowie HuT78 Zellen (kutane T-Lymphoblastomlinie) und U937 Zellen (histiozytisches Lymphom) zeigten nach zwölf Stunden Apoptose-Stimulation keine messbare Annexin-I-Exposition. Die Westernblot-Analyse ergab, dass in allen Zelllinien, die Annexin I externalisierten, nach Apoptose-Induktion neben der 38-kDa-Volllängen-Form auch eine 35 kDa große Spaltform von Annexin I nachweisbar war (Abbildung 3.17C). Am deutlichsten war die Prozessierung in Jurkat Zellen, die auch die stärkste Annexin-I-Oberflächen-

exposition aufwiesen. In Zellen, die kein Annexin I externalisierten, war keine Spaltung detektierbar (HuT78, HL60, U937 und THP-1), zudem war die Annexin-I-Expression in THP-1 Zellen auffallend geringer als in allen anderen Zelllinien. Mit einem anti-Vinculin-Antikörper wurde belegt, dass dabei vergleichbare Mengen an Zelllysat analysiert wurden.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die spät-apoptotische Externalisierung von Annexin I offensichtlich mit einer Annexin-I-Prozessierung einhergeht, abhängig vom Zelltyp ist und sich auf wenige der untersuchten Zelllinien beschränkt. Offen bleibt, ob zwischen Spaltung und Externalisierung ein kausaler Zusammenhang besteht, und falls ja, welches Ereignis das andere bedingt.

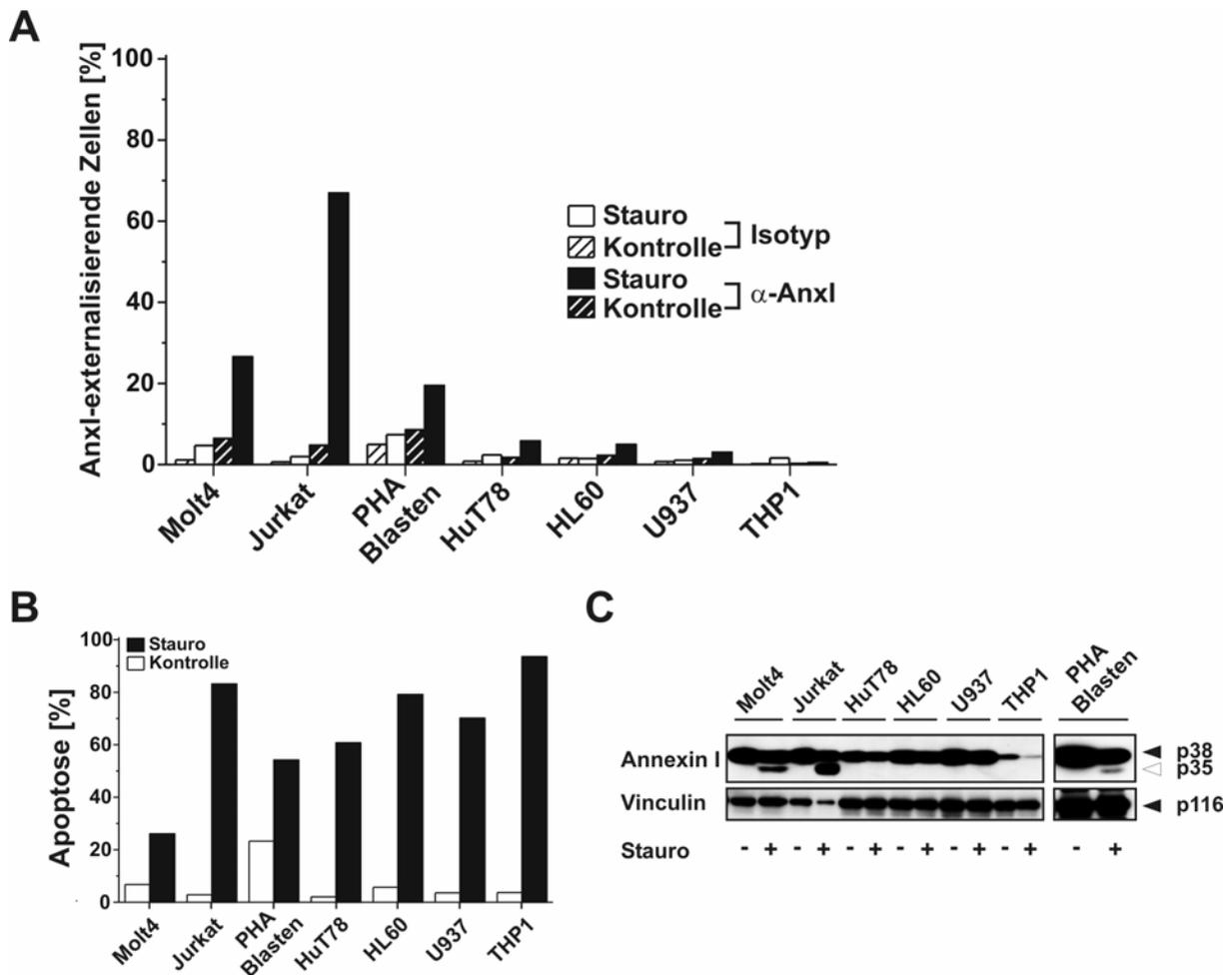


Abbildung 3.17: Annexin-I-Externalisierung und Spaltung in verschiedenen Zelllinien.

(A) Annexin-I-Externalisierung nach 12 h Apoptose bei verschiedenen Zellen. 1×10^5 Zellen wurden für 12 h in $150 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium $\pm 2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin inkubiert, wie unter 3.15A gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Annexin-I-positiver Zellen als Mittelwert aus Duplikaten.

(B) DNA-Fragmentierung bei verschiedenen Zellen nach 24 h Stimulation. Zellen wurden 24 h lang wie in A behandelt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil hypodiploider Nuklei durch Färbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid als Maß für die Apoptose durchflusszytometrisch bestimmt.

(C) Annexin I Prozessierung in verschiedenen Zelllinien. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in $1,5 \text{ mL}$ Zellkulturmedium $\pm 2,5 \mu\text{M}$ Staurosporin für 24 h stimuliert, PHA-Blasten nur 12 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert, in einer SDS-PAGE (8 - 15 %) elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit anti-Annexin-I- bzw. anti-Vinculin-Antikörper unterzogen.

3.4.5 Externalisiertes Annexin I bindet Calcium-abhängig an die phosphatidylserinreiche Oberfläche apoptotischer Zellen

Bereits Arur et al. und Fan et al. zeigten, dass externalisiertes Annexin I auf apoptotischen Jurkat Zellen an Phosphatidylserin (PS) bindet (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004). Ob dies auch für die hier beobachtete Oberflächen-Exposition von Annexin I gültig ist und welcher Teil von Annexin I für die Bindung auf apoptotischen Jurkat Zellen verantwortlich ist, sollte nachfolgend näher untersucht werden.

Dazu wurde in Jurkat Zellen mit Staurosporin Apoptose induziert und die Zellen vor der Annexin I / Propidiumiodid-Doppelfärbung mit Calciumchlorid-haltigem Puffer oder EGTA gewaschen. In Abbildung 3.18A ist deutlich zu sehen, dass auf den EGTA-gewaschenen apoptotischen Zellen im Gegensatz zu den mit CaCl_2 inkubierten Zellen kein Annexin I mehr nachgewiesen werden konnte. In Abbildung 3.18B ist der prozentuale Anteil Annexin-I-positiver Zellen über die gesamte Population dargestellt. Um zu untersuchen, welcher Teil von Annexin I für die Calcium-abhängige Bindung notwendig ist, wurden vitale oder früh-apoptotische Jurkat Zellen, die bereits PS externalisierten jedoch noch kein endogenes Annexin I, mit gereinigten Cy2^{TM} -markierten Annexin-I-Fragmenten mit EGTA oder mit Calcium inkubiert. Dazu wurden die Annexin-I-Konstrukte aa1-346 (Volllängenprotein), aa47-346 (N-terminal trunkiert) und aa1-46 (N-Terminus ohne Calcium- und Phospholipid-bindende Annexin-Boxen) verwendet (Struktur von Annexin I: siehe Abbildung 1.6). Auf vitalen Kontrollzellen wurde in keinem Fall eine Bindung von Annexin I nachgewiesen (Abbildung 3.18C). Auf apoptotischen Zellen wurde in Anwesenheit von CaCl_2 sowohl das Volllängen-Protein Anxl aa1-346 als auch der C-terminale Teil Anxl aa47-346 gebunden, für den N-Terminus (aa1-46) konnte keine Bindung nachgewiesen werden. In Gegenwart des Calcium-Chelators EGTA dagegen konnte auf apoptotischen Jurkat Zellen keines der Fragmente gebunden werden.

Der Frage, ob die beobachtete Ca^{2+} -abhängige Bindung von Annexin I auf der Oberfläche apoptotischer Zellen tatsächlich über Phosphatidylserin erfolgt, wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen nachgegangen. Zum einen sollte die Bindung von Annexin I an Phosphatidylserin *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde rekombinantes Annexin I mit Micellen, die entweder aus Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin bestanden oder nur PC enthielten, mit 5 mM CaCl_2 oder 10 mM EGTA zwei Stunden bei 50.000 g und 4°C zentrifugiert. Ohne Phosphatidylserin ließ sich Annexin I sowohl in Gegenwart von Calcium als auch von EGTA etwa zum gleichen Teil unspezifisch pelletieren (Abbildung 3.18D), wobei sich der größere Teil des eingesetzten Proteins im Überstand befand. Die gleiche Proteinverteilung wurde mit Phosphatidylserin-haltigen Micellen und EGTA beobachtet. Bei Zentrifugation mit Phosphatidylserin und Calcium wurde Annexin I dagegen quantitativ präzipitiert, und es konnte kein Protein mehr im Überstand nachgewiesen werden. Um zu zeigen, dass Phosphatidylserin auch im Zellkultursystem für die Calcium-abhängige Bindung von Annexin I an die Membranoberfläche essentiell ist, wurden vitale Jurkat Zellen mit Ionomycin behandelt und anschließend mit Cy2^{TM} -markierten rekombinanten Annexin-I-Fragmenten inkubiert. Das Calcium-Ionophor Ionomycin führt in Jurkat Zellen in dem hier untersuchten Versuchszeitraum zu einer schnellen und selektiven Phosphatidylserin-Externalisierung, ohne dass dabei sonstige aus der Apoptose bekannte Oberflächenveränderungen der Membran auftreten. Wie in Abbildung 3.18E dargestellt, wurde das N-terminale Anxl-Fragment (aa1-47) in Anwesenheit von Calciumchlorid weder

auf vitalen noch auf Ionomycin-stimulierten Zellen gebunden. Das Core-Fragment (Anxl aa47-346) und das Volllängenprotein wurden an Ionomycin-behandelte Zellen gebunden, während sie an unbehandelten Kontrollzellen deutlich schlechter gebunden wurden. Mit EGTA ließ sich die Bindung komplett unterdrücken (Daten nicht gezeigt).

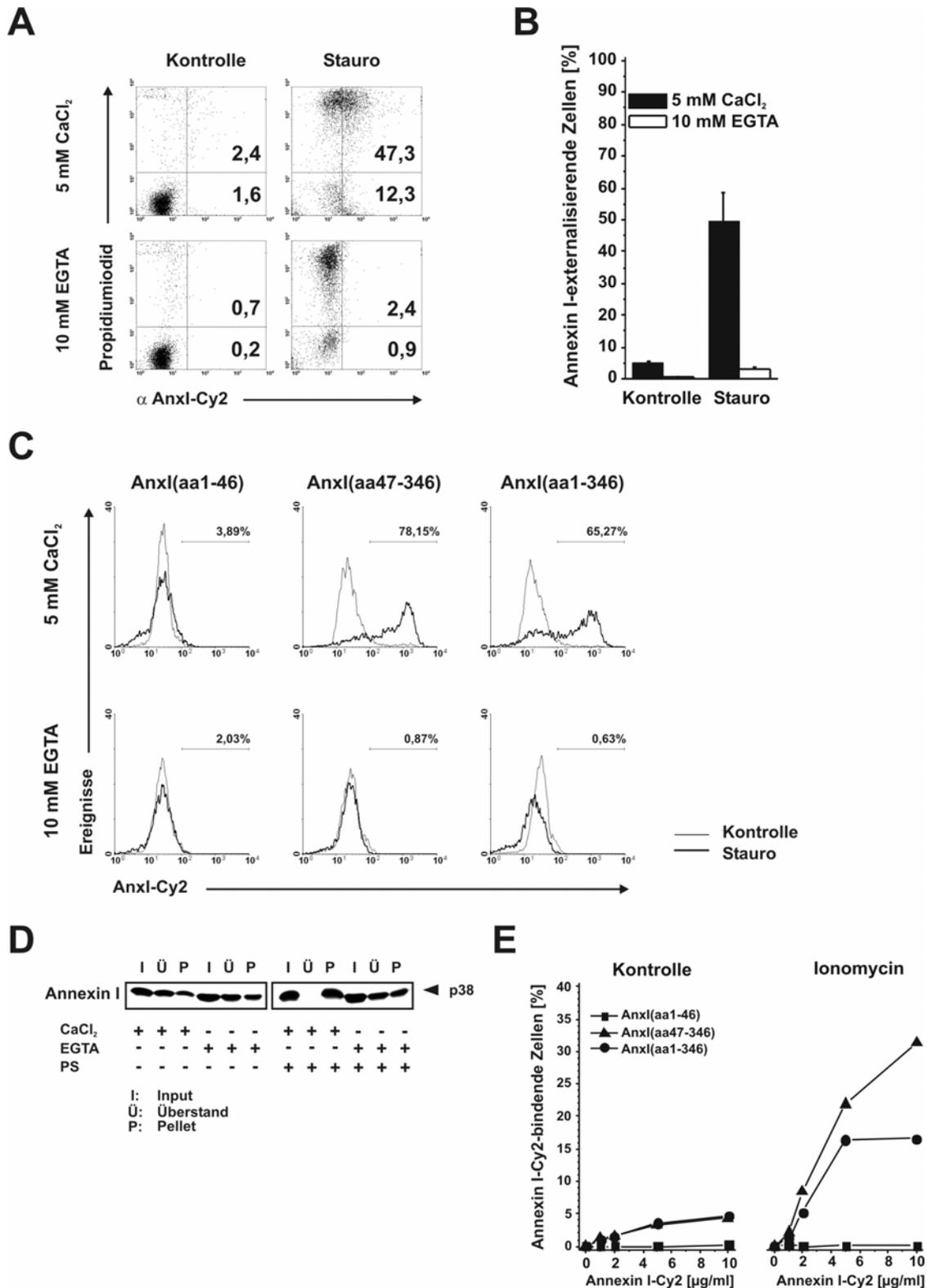


Abbildung 3.18: Annexin I bindet Calcium-abhängig an (externalisiertes) Phosphatidylserin.

(A) Durchflusszytometrische Messung von externalisiertem Annexin I in An- oder Abwesenheit von Calcium. 1×10^5 Jurkat Zellen wurden für 12 h in 150 μ l Zellkulturmedium \pm 2,5 μ M Staurosporin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in TBS + 5 mM CaCl_2 oder 10 mM EGTA gewaschen und mit anti-Annexin-I- und anti-Maus-Cy2TM-Antikörper sowie Propidiumiodid doppelgefärbt. Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots, wobei auf der x-Achse die Cy2TM (FI1) und auf der y-Achse die Propidiumiodid-Färbung (FI2) aufgetragen sind.

(B) Quantitative Bestimmung des Anteils Annexin-I-exponierender Zellen. Aus den Quadranten-Darstellungen in A wurde der prozentuale Anteil Annexin-I-positiver Zellen errechnet und ist als Mittelwert mit Standardabweichung aus Triplikaten angegeben.

(C) Bindung verschiedener Annexin-I-Fragmente an apoptotische Zellen. 1×10^5 Jurkat-Zellen wurden für 3 h in 150 μ l Zellkulturmedium in An- oder Abwesenheit von 2,5 μ M Staurosporin in einer 96-well-Platte bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mM CaCl_2 oder 10 mM EGTA und 5 μ g/mL Cy2TM-markierten rekombinanten Annexin-I-Fragmenten (aa1-46, aa47-346 und aa1-346) sowie Propidiumiodid inkubiert und danach durchflusszytometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Histogramme der Propidiumiodid-negativen Zellpopulation. Der Anteil der Cy2TM-gefärbten apoptotischen Population ist jeweils angegeben.

(D) Präzipitation von rekombinatem Annexin I mit Phosphatidylserin-Micellen und Nachweis mittels Silberfärbung. Jeweils 1 μ g rekombinantes Vollängen-Anxl (aa1-346) wurde in Gegenwart von 5 mM CaCl_2 oder 10 mM EGTA mit 100 μ g Phosphatidylserin-Micellen (PS) 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 2 h bei 50.000 g und 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment wurde einmal mit TBS + 5 mM CaCl_2 bzw. 10 mM EGTA gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, mit TCA gefällt und zusammen mit dem jeweiligen Pellet und einem nicht zentrifugierten Ansatz (Input) in einer SDS-PAGE (8 - 15 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Silberfärbung.

(E) Bindung von Cy2TM-markiertem rekombinatem Annexin I an die Zelloberfläche von Ionomycin-behandelten Jurkat-Zellen. 1×10^5 vitale Jurkat-Zellen \pm 4 μ M Ionomycin wurden in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 mit 0 - 10 μ g/mL Cy2TM-markierten rekombinanten Annexin-I-Fragmenten und Propidiumiodid doppelgefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Propidiumiodid negativer und Cy2TM positiver Zellen als Mittelwert aus Duplikaten.

3.4.6 Der knock down von Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose spät-apoptotischer Jurkat-Zellen

Wie bis hierher gezeigt werden konnte, wird Annexin I in apoptotischen Jurkat Zellen prozessiert, externalisiert und auf der Phosphatidylserin-reichen Oberfläche Calcium-abhängig gebunden. Arur und Fan zeigten in ihren Veröffentlichungen, dass Annexin I die Phagozytose apoptotischer Zellen stimuliert (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004). Deshalb lag die Vermutung nahe, auch die hier beobachtete Annexin-I-Externalisierung apoptotischer Jurkat Zellen könnte einen Einfluss auf deren Eliminierung haben. Um dies zu untersuchen, wurden Jurkat Zellen 14 h nach UV-Bestrahlung entweder mit Calciumchlorid- oder EGTA-haltigem Puffer gewaschen und mit ausdifferenzierten THP-1 oder U937 Makrophagen inkubiert. Abbildung 3.19A zeigt, dass das Abwaschen von Annexin I von der Oberfläche apoptotischer Jurkat Zellen mit EGTA-Puffer zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die Phagozytose durch THP-1 und U937 Zellen hatte. Ein Problem bei dieser Methode könnte jedoch sein, dass eine Annexin-I-Externalisierung auch während der Ko-Inkubation von Phagozyten und apoptotischen Beutezellen stattgefunden haben könnte und so bei längerer Inkubationsdauer der Effekt der EGTA-Vorbehandlung der apoptotischen Zellen reversibel sein könnte. Die von Fan et al. beobachtete inhibierte Phagozytose durch das Abwaschen von Annexin I wurde nach 30-minütiger Ko-Inkubation von apoptotischen Zellen und Makrophagen gemessen (Fan et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit, wie in Abbildung 3.19A dargestellt, nach 30 bzw. 45 Minuten Phagozytose (THP-1 oder U937 Makrophagen) kein Unterschied nachgewiesen werden, jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Anteil internalisierter Jurkat Zellen und der Phagozytose-Index sehr gering.

Um dieses Problem zu umgehen und die Annexin-I-Externalisierung während der Apoptose nachhaltiger reduzieren zu können, wurden Jurkat Zellen vor den Phagozytostests mit Annexin-I-spezifischer siRNA transfiziert, um die Annexin-I-Expression und damit auch die Externalisierung zu inhibieren. 6 Tage nach der 1. Transfektion war das Expressions-Niveau am stärksten reduziert und

die Zellen wurden 14 h nach Apoptose-Induktion an THP-1 bzw. U937 Makrophagen verfüttert. Der *knock down* von Annexin I mit zwei spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (nt148 und nt893) hatte im Vergleich zu den mit Kontroll-Oligonukleotid (*Scramble*) behandelten Jurkat Zellen keinen Einfluss auf die Phagozytose der Zellen, weder mit THP-1 noch mit U937 Fresszellen (Abbildung 3.19B). Abbildung 3.19C zeigt die Westernblot-Analyse der Annexin-I-Expression in Jurkat Zellen zum Zeitpunkt der Apoptose-Induktion. Mit beiden spezifischen siRNA's konnte die Expression sehr deutlich reduziert, wenn auch nicht komplett inhibiert werden. Als Ladekontrolle diente Vinculin.

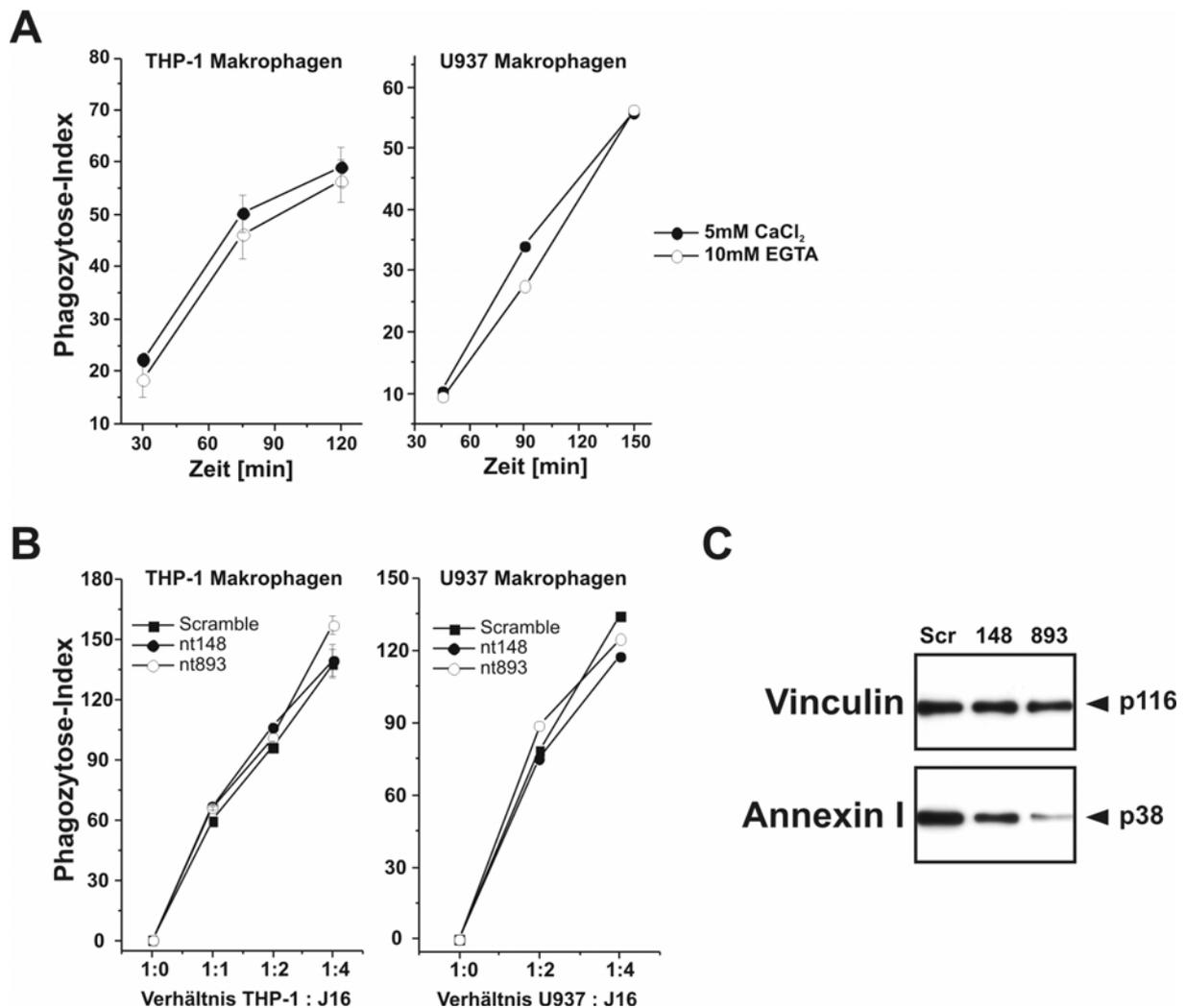


Abbildung 3.19: Abwaschen oder *knock down* von Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose spät-apoptotischer Jurkat Zellen.

(A) Phagozytose von Jurkat Zellen durch THP-1 und U937 Makrophagen nach dem Abwaschen von Annexin I. Monozytäre THP-1 und U937 Zellen wurden 3 Tage vor den Tests mit grünem PKH67 Farbstoff angefärbt. Dann wurden jeweils 100.000 THP-1 oder U937 Zellen in 24-well-Platten mit 1 nM (THP-1) bzw. 10 nM PMA (U937) für 16 h inkubiert, das PMA-Medium abgewaschen und die Zellen zur weiteren Differenzierung für 48 h in Zellkulturmedium inkubiert. Jurkat Zellen wurden mit rotem PKH26 Farbstoff gefärbt, in serumfreiem Medium mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und 14 h inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x in TBS mit 10 mM EGTA oder 5 mM CaCl₂ gewaschen und je 200.000 Jurkat Zellen in serumfreiem Medium mit den ausdifferenzierten Makrophagen für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Analyse der Phagozytostests erfolgte durchflusszytometrisch (siehe 2.2.6). Angegeben sind die Mittelwerte aus Dublikaten bzw. Mittelwert ± Standardabweichung aus Triplikaten.

(B) Phagozytose nach Annexin-I-*knock-down* in Jurkat Zellen. Monozytäre THP-1 und U937 Zellen wurden wie unter 3.19A gefärbt und ausdifferenziert. Jurkat Zellen wurden an den Tagen 6 und 3 vor den Tests mit 100 µM Anxi-siRNA elektroporiert (2 spezifische siRNA-Oligonukleotide (nt148 und nt893) bzw. Kontroll-Oligonukleotid (*Scramble*)). Dann wurden die Zellen mit rotem PKH26 Farbstoff gefärbt, in serumfreiem Medium mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und 14 h inkubiert. Danach wurden die Zellen in serumfreiem Medium in den angegebenen Verhältnissen mit den ausdifferenzierten Makrophagen inkubiert (mit

THP-1 für 2 h, mit U937 für 2,5 h). Die Analyse der Phagozytostests erfolgte durchflusszytometrisch (siehe 2.2.6). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten bzw. Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

(C) Annexin-I-Expression nach knock down. Jurkat Zellen wurden wie unter 2.2.3 beschrieben zweimal mit zwei Anxl-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (148 bzw. 893) oder Kontroll-Oligonukleotid (Scr) elektroporiert. Nach insgesamt 6 Tagen Inkubationsdauer wurden die Zellen geerntet, lysiert und 7 μ g Protein pro Probe in einer SDS-PAGE (12 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem anti-Annexin-I-Antikörper, als Ladekontrolle wurde Vinculin detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot aus mehreren Versuchen.

3.4.7 Die Beschichtung apoptotischer THP-1 Zellen mit Annexin I stimuliert deren Phagozytose

Wie unter 3.4.6 dargestellt, hatte das Abwaschen von Annexin I und der Annexin-I-*knock-down* keinen wesentlichen Einfluss auf die Phagozytose spät-apoptotischer Jurkat Zellen durch verschiedene Makrophagen. Dies könnte daran liegen, dass Annexin I lediglich eines von mehreren Brückenmolekülen der phagozytotischen Synapse darstellt (Lauber et al., 2004) und das Fehlen eines Faktors nicht unbedingt zu einer messbar eingeschränkten Phagozytose apoptotischer Zellen führen muss. Es könnte jedoch auch daran liegen, dass obwohl der Annexin-I-*knock-down* sehr effektiv war, noch eine geringe Annexin-I-Expression nachweisbar war (siehe Abbildung 3.19C) und diese ausreichend für die Funktion von Annexin I während der Phagozytose sein könnte. Deshalb sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob eine Annexin-I-Beschichtung von Zellen, die während der Apoptose kein Annexin I externalisieren, Einfluss auf die Phagozytose dieser Zellen hat.

Dazu wurden als apoptotische Beutezellen THP-1 Monozyten verwendet, die eine sehr geringe endogene Annexin-I-Expression aufweisen und während der Apoptose kein Annexin I externalisieren (Abbildung 3.17A und C), jedoch nach Apoptose-Induktion eine deutliche PS-Externalisierung zeigen (Daten nicht gezeigt). Die THP-1 Zellen wurden dazu mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und nach 12 h entweder mit gereinigtem rekombinantem Annexin I (aa1-46, aa1-346 und aa47-346), fettsäurefreiem BSA oder TBS (Kontrolle) inkubiert. Nach der Beladung der Zellen wurden diese in unterschiedlichen Verhältnissen für 2,5 h mit U937 Makrophagen bzw. für 2 h mit THP-1 Makrophagen inkubiert. Somit wurden THP-1 Zellen in diesem Ansatz sowohl als apoptotische „Beute“ als auch in ausdifferenzierter Form als Phagozyten eingesetzt. Abbildung 3.20A zeigt, dass die Phagozytose apoptotischer THP-1 Zellen durch U937 sowohl mit der Volllängenform von Annexin I (aa1-346) als auch mit dem Core-Fragment (aa47-346) gegenüber der Kontrolle, der Inkubation mit dem N-Terminus (aa1-46) oder BSA deutlich verstärkt war. Wurden THP-1 Zellen als Phagozyten eingesetzt, war dieser Effekt noch stärker zu sehen und der Phagozytoseindex nach Beladung mit Anxl aa1-346 und aa47-346 mehr als doppelt so hoch im Vergleich zur Kontrolle.

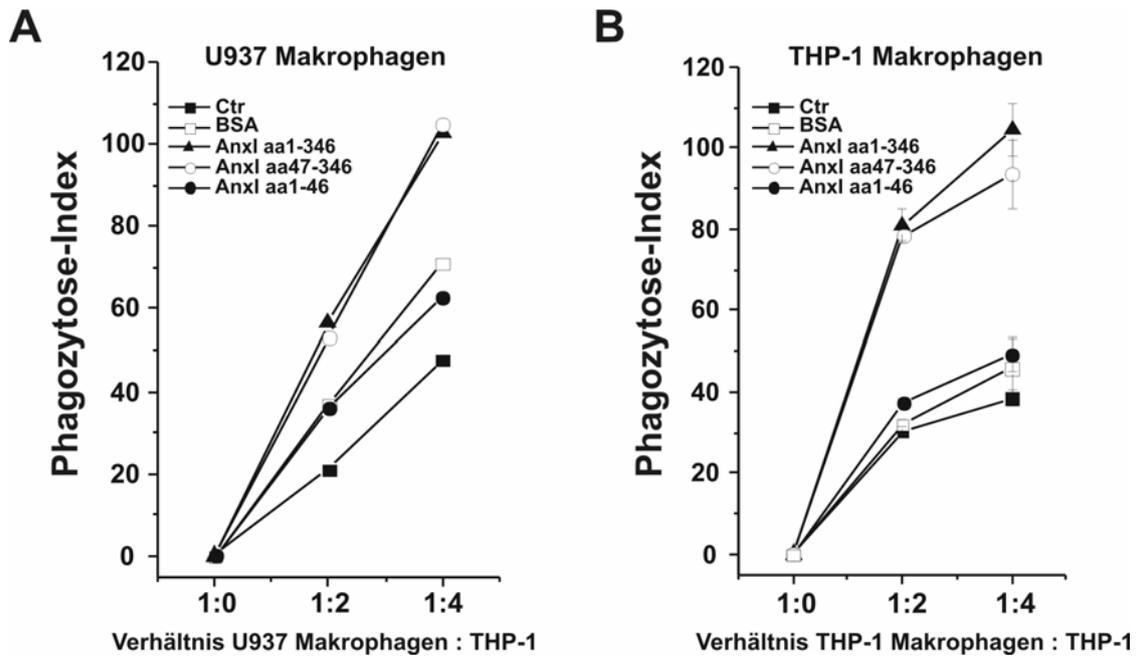


Abbildung 3.20: Extern zugegebenes Annexin I verstärkt die Phagozytose von apoptotischen THP-1 Zellen

(A) Phagozytose apoptotischer THP-1 Zellen durch U937 Makrophagen nach Beschichtung mit verschiedenen Annexin-I-Formen. Monozytäre U937 Zellen wurden mit grünem PKH67 Farbstoff gefärbt, für 16 h mit 10 nM PMA stimuliert und anschließend für weitere 48 h in Zellkulturmedium ohne PMA inkubiert. THP-1 Zellen wurden mit rotem PKH26 Farbstoff angefärbt, mit 10 mJ/cm² UV-Licht bestrahlt und für 12 h in serumfreiem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 µM gereinigtem humanem Anxl aa1-346 (Volllänge), aa47-346 (N-terminal trunziert) und aa1-47 (N-Terminus) oder fettsäurefreiem BSA (alles in TBS + 5 mM CaCl₂) für 30 min bei 4°C inkubiert oder nur in TBS + 5 mM CaCl₂ inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, in serumfreiem Medium aufgenommen und in verschiedenen Verhältnissen zu den ausdifferenzierten U937 Zellen gegeben und für 2,5 h inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch (siehe 2.2.6). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dublikaten.

(B) Einfluss von Annexin I auf die Phagozytose apoptotischer THP-1 Zellen durch THP-1 Makrophagen. Monozytäre THP-1 Zellen wurden mit PKH67 grün gefärbt, mit 1 nM PMA für 16 h stimuliert und anschließend für weitere 48 h in Zellkulturmedium differenziert. Die THP-1-Beutezellen wurden wie unter 3.20A gefärbt, UV-bestrahlt, mit verschiedenen gereinigten Annexin-I-Formen (siehe 2.1.4) oder BSA inkubiert und mit THP-1 Makrophagen für 2 h in serumfreiem Medium kokultiviert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch, dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus Triplikaten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Annexin I offensichtlich keinen Einfluss auf die iPLA₂-vermittelte Produktion löslicher Attraktionssignale wie Lysophosphatidylcholin während der Apoptose hat. Vielmehr wird Annexin I in einigen Zelllinien während der Apoptose prozessiert und auf der Zelloberfläche als Brückenmolekül in der phagozytotischen Synapse präsentiert, wobei die Bindung Calcium-abhängig an Phosphatidylserin erfolgt. Das Abwaschen oder der *knock down* von Annexin I hat keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer, Annexin-I-externalisierender Jurkat Zellen. Dies könnte möglicherweise an der Redundanz der verschiedenen auf apoptotischen Zellen präsenten „eat-me“-Signalen liegen. Dagegen kann die Phagozytose von Zellen, die während der Apoptose keine Annexin-I-Exposition zeigen, durch die Beschichtung dieser Zellen mit Annexin I deutlich verstärkt werden.

4 Diskussion

4.1 Prozessierung und Aktivierung der iPLA₂ während der Apoptose

Neben den bekannten, auf apoptotischen Zellen gebundenen Phagozytose- bzw. „eat-me“-Signalen, die für eine effiziente Eliminierung sterbender Zellen notwendig sind, war lange Zeit wenig bekannt über die Signale, die professionelle Phagozyten zu ihren Beutezellen führen. Eine zentrale Entdeckung war, dass apoptotische Zellen Lysophosphatidylcholin (LPC) freisetzen, das zur Anlockung und damit zur aktiven Migration von Monozyten führt (Lauber et al., 2003). LPC entsteht dabei durch die iPLA₂-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC), einem Hauptbestandteil der Plasmamembran. Dabei hat man beobachtet, dass iPLA₂ während der Apoptose Caspase-3-abhängig prozessiert wird und danach mehr LPC freigesetzt wird. Die genauen Mechanismen jedoch, die zur Generierung und Freisetzung von LPC in apoptotischen Zellen führen, waren bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die beobachtete Spaltung von iPLA₂ tatsächlich zu deren Aktivierung führt und ob dies hinreichend für die Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals LPC ist. Zuerst wurde dazu das genaue iPLA₂-Prozessierungsmuster in apoptotischen MCF7_{casp3} und MCF7_{vektor} Zellen analysiert und festgestellt, dass sowohl die Volllängenform von iPLA₂ (aa1-806) als auch ein intermediäres Konstrukt (iPLA₂ aa514-806) ausschließlich in Caspase-3-exprimierenden Zellen an den Caspase-Schnittstellen DLFD⁵¹³ und MVVD⁷³³ gespalten werden. Dadurch entsteht ein 26 kDa großes Fragment, das der Aminosäuresequenz von iPLA₂ aa514-733 entspricht (siehe Abschnitt 3.1.1). Dass diese Prozessierung direkt durch Caspase-3 und nicht durch eine andere Protease geschieht, konnte *in vitro* durch den Verdau gereinigter iPLA₂ mit gereinigter Caspase-3 gezeigt werden (Abbildung 3.1C). Die von Atsumi et al. beschriebene Spaltung in ein 70-kDa-Fragment (iPLA₂ aa184-806) (Atsumi et al., 2000) konnte in der vorliegenden Arbeit insofern nachvollzogen werden, als dass bei der Prozessierung auch ein etwa 70 kDa großes, intermediäres Fragment detektierbar war. Jedoch war sowohl im Rahmen der Untersuchungen von apoptotischen Zelllysaten als auch bei den *in vitro*-Versuchen das 26 kDa große Spaltfragment von iPLA₂ als finales Produkt nachweisbar (Abbildung 3.1B und C). Atsumi et al. zeigten außerdem, dass die Prozessierung von iPLA₂ nach CD95-induzierter Apoptose zu einer gesteigerten Arachidonsäurefreisetzung dieser Zellen führt (Atsumi et al., 2000), während sie in einer früheren Arbeit keine veränderte iPLA₂-Aktivität in den entsprechenden Zelllysaten nachweisen konnten (Atsumi et al., 1998). Deshalb wurde vermutet, die Spaltung von iPLA₂ könnte zu einer veränderten Affinität des Enzyms zu intrazellulären Membranen und damit zum Substrat PC führen. In der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch die Analyse der Lokalisation der verschiedenen iPLA₂-Konstrukte in vitalen Zellen eine gleichmäßige, unveränderte Verteilung aller iPLA₂-Formen zwischen Cytosol- und Membranfraktion und somit auch nach der Prozessierung keine messbar veränderte Lokalisation des Enzyms zugunsten einer verstärkten Membranbindung (Abbildung 3.1D).

In ihrer Veröffentlichung konnten Atsumi et al. weiterhin zeigen, dass während der Apoptose sowohl iPLA₂ als auch cPLA₂ gespalten werden, wobei cPLA₂ im Gegensatz zur iPLA₂ durch die Prozessierung inaktiviert wird (Atsumi et al., 2000). Außerdem konnten sie nach Expression eines 70-

kDa-iPLA₂-Fragments eine gesteigerte Arachidonsäure-Freisetzung nachweisen, jedoch keine erhöhte iPLA₂-Aktivität (siehe oben). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die Spaltung der Volllängen-iPLA₂ in ein 26 kDa großes Fragment zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des Enzyms führt (siehe Abschnitt 3.1.2). Dies konnte sowohl bei einer durchflusszytometrischen Messung als auch in Zelllysaten gezeigt werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Caspase-3-vermittelte Spaltung der iPLA₂ tatsächlich auch zu deren Aktivierung führt.

Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche Regulierung der iPLA₂-Aktivität, z.B. durch Interaktion mit möglichen Inhibitoren, erfolgt, da iPLA₂ nativ als oligomerer Komplex mit einem Molekulargewicht von 270 - 350 kDa von Larsson et al. und Ackermann et al. beschrieben wurde. Die Autoren haben die Vermutung formuliert, dass in diesem Komplex neben dem Volllängenprotein auch alternative Splice-Isoformen von iPLA₂, wie die Ankyrin-Motive, gebunden sein könnten, die inhibitorisch auf die iPLA₂-Aktivität wirken (Ackermann et al., 1994; Larsson et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht beobachtet werden, dass die Überexpression der N-terminalen Ankyrin-Motive ohne aktives Zentrum (aa1-512) zu einer verminderten LPC-Freisetzung während der Apoptose führt. Somit kann die Hypothese von Larsson et al. zumindest für apoptotische Zellen hier nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 3.5). Möglicherweise liegt dieser Regulationsmechanismus auch nur in vitalen Zellen vor und wird durch die Caspase-3-vermittelte Prozessierung von iPLA₂ aufgehoben.

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die iPLA₂ in vitalen Zellen Calcium-abhängig mit Calmodulin assoziiert ist und diese Interaktion zu einer verminderten iPLA₂-Aktivität führt (Jenkins et al., 2001; Smani et al., 2004). Durch die Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher kommt es zur Freisetzung des so genannten *Calcium Influx Factors* (CIF), der Calmodulin aus der Bindung mit iPLA₂ verdrängt und so zu deren Aktivierung führt. Dabei konnten zwei mögliche Calmodulin-Bindungsdomänen für iPLA₂ identifiziert werden, die zwischen dem aktiven Zentrum (GTST⁵²⁰) und dem C-Terminus liegen. Durch die Prozessierung der Volllängenform von iPLA₂ (aa1-806) zu iPLA₂ aa514-733 (26 kDa) wird lediglich eines der Calmodulin-Bindungsmotive abgespalten und somit wäre eine Assoziation der 26 kDa iPLA₂-Form mit Calmodulin denkbar. Da jedoch, wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt, iPLA₂ aa514-733 auch in vitalen Zellen eine deutlich höhere Aktivität aufwies als das Volllängenprotein, scheint diese mögliche Calmodulin-Bindung keinen wesentlichen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität der prozessierten iPLA₂ zu haben. Trotzdem kann eine regulatorische Funktion von Calmodulin auf die iPLA₂-Aktivität sowohl in vitalen als auch in apoptotischen Zellen an dieser Stelle nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Faktor, der hemmend auf die iPLA₂-Aktivität wirken könnte, ist die potentielle Interaktion mit dem Phospholipase-A₂-Inhibitor Annexin I. In diesem Zusammenhang konnte eine direkte Interaktion von Annexin I mit der cytosolischen, Calcium-abhängigen Phospholipase A₂ (cPLA₂) durch Ko-Immünpräzipitationen nachgewiesen werden, wobei die Bindung über den N-Terminus von cPLA₂ erfolgt (Kim et al., 2001). Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass die Überexpression von Annexin I inhibitorisch auf die Gesamt-PLA₂-Aktivität wirkt. In einer weiteren Arbeit wurde zusätzlich belegt, dass der *knock down* von Annexin I zu einer gesteigerten PLA₂-Aktivität führt, jedoch wiesen die Autoren darauf hin, dass dabei nicht zwischen spezifischer cPLA₂- und iPLA₂-Aktivität

unterschieden werden konnte (Solito et al., 1998). Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Annexin I mit $iPLA_2$ assoziiert ist und möglicherweise Einfluss auf deren Aktivität und damit auf die Generierung des Attraktionssignals LPC hat. Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, konnte in vitalen MDA-MB 231 Zellen keine Interaktion von Annexin I mit der $iPLA_2$ nachgewiesen werden, und weder die Induktion der Annexin-I-Expression mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) noch die Überexpression verschiedener Annexin-I-Konstrukte in $MCF7_{casp3}$ Zellen führte zu einer verminderten Freisetzung des Attraktionssignals nach Apoptose-Induktion. Dies lässt darauf schließen, dass Annexin I in apoptotischen Zellen nicht inhibitorisch auf die $iPLA_2$ -Aktivität wirkt und somit keinen Einfluss auf die LPC-Generierung hat.

4.2 Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose

Bis hierher konnte gezeigt werden, dass $iPLA_2$ während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert wird und dadurch ein 26 kDa großes Spaltfragment entsteht ($iPLA_2$ aa514-733), das eine wesentlich höhere Aktivität aufweist als das Vollängenprotein (aa1-806) oder die 32-kDa- $iPLA_2$ aa514-806. Wie bereits erwähnt, konnten Atsumi et al. beobachten, dass nach Überexpression der $iPLA_2$ Spaltform aa184-806 sowohl vitale als auch apoptotische HEK293 Zellen mehr Arachidonsäure freisetzen als Zellen, die das Vollängenprotein exprimieren (Atsumi et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die Überexpression der $iPLA_2$ zu einer verstärkten Generierung von Lysophosphatidylcholin und Arachidonsäure führt (Perez et al., 2004) und LPC auf der Oberfläche apoptotischer Zellen wichtig ist für eine effiziente Eliminierung dieser Zellen (Kim et al., 2002; Perez et al., 2006). Dass das durch die $iPLA_2$ -vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylcholin entstehende LPC auch als lösliches Attraktionssignal in die Überstände apoptotischer Zellen freigesetzt wird und zur Anlockung von Phagozyten führt, zeigten Lauber et al. LPC wurde dabei durch eine massenspektrometrische Analyse der Überstände vitaler und apoptotischer Zellen bestimmt (Lauber et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte ergänzend dazu eine direkte Quantifizierung der freigesetzten Menge an LPC vorgenommen werden. Aus den Zellkulturüberständen von vitalen und apoptotischen $MCF7_{casp3}$ Zellen wurden die Lipide extrahiert und mittels eines enzymatischen Tests LPC nachgewiesen. Apoptotische Zellen setzten demnach im Vergleich mit vitalen Zellen etwa die doppelte Menge an LPC frei. Bei dem gewählten Ansatz von 2×10^6 Zellen pro mL Überstand entsprach dies einer Konzentration von 100 nM (siehe Abbildung 3.3). Damit konnte bestätigt werden, dass apoptotische $MCF7_{casp3}$ Zellen das Phospholipid-Attraktionssignal LPC freisetzen, wie bereits durch die massenspektrometrischen Analysen von Lauber et al. gezeigt (Lauber et al., 2003).

Da bei der $iPLA_2$ -vermittelten hydrolytischen Spaltung von Phospholipiden neben einer freien Fettsäure (meist Arachidonsäure) Lysophospholipide entstehen, und $iPLA_2$ wichtig ist für die Generierung des apoptotischen Attraktionssignals LPC (Lauber et al., 2003), sollte untersucht werden, ob die in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 gezeigte Spaltung und Aktivierung von $iPLA_2$ hinreichend für die gemessene LPC-Freisetzung ist (siehe Abschnitt 3.2.1). Es zeigte sich, dass die Hemmung von $iPLA_2$ mit dem spezifischen $iPLA_2$ -Inhibitor Bromanollacton (BEL) konzentrationsabhängig zu einem verminderten chemotaktischen Potential der Überstände apoptotischer Zellen führte, unabhängig vom

verwendeten Apoptose-Stimulus (siehe Abbildung 3.4). Ab einer Konzentration von 10 - 15 μM BEL war die Migration der THP-1 Monozyten komplett inhibiert und das chemotaktische Potential der Überstände apoptotischer Zellen vergleichbar mit dem der Überstände vitaler Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Prozessierung und Aktivierung von $i\text{PLA}_2$ Expressionskonstrukte verwendet, die ausgehend von der Sequenz der 86 kDa $i\text{PLA}_2\beta$ (aa1-806) hergestellt wurden (Larsson et al., 1998). Durch die Verwendung der R- und S-Enantiomere von BEL, die spezifisch die Isoformen $i\text{PLA}_2\gamma$ (R-BEL) bzw. $i\text{PLA}_2\beta$ (S-BEL) inhibieren (Jenkins et al., 2002; Yan et al., 2005) konnte zudem gezeigt werden, dass tatsächlich aktive $i\text{PLA}_2\beta$ essentiell für die Generierung des Attraktionssignals LPC während der Apoptose ist (Abbildung 3.4B).

Für den hier verwendeten $i\text{PLA}_2$ -Inhibitor BEL wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen konzentrationsabhängige pro- und anti-apoptotische Effekte beschrieben. So zeigten Fuentes et al., dass mit einer Konzentration von 25 μM BEL in vitalen U937 Zellen bereits nach 2 h die Prozessierung von Caspasen und des Caspase-Substrats PARP induziert werden kann und die Zellen nach längerer Inkubationsdauer eine deutliche Phosphatidylserin-Externalisierung und DNA-Fragmentierung aufweisen (Fuentes et al., 2003). Eine verzögerte PS-Externalisierung durch die Behandlung apoptotischer peripherer Blut-T-Lymphozyten mit 10 μM BEL belegte dagegen eine andere Veröffentlichung, jedoch waren hier sowohl die Caspase-3-Aktivität als auch die PARP-Spaltung unverändert (Kim et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Analyse der Spaltung des Caspase-Substrats Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) in $\text{MCF7}_{\text{casp3}}$ Zellen in An- oder Abwesenheit von 20 μM BEL nach Apoptose-Induktion, dass die Inhibierung von $i\text{PLA}_2$ durch BEL weder einen hemmenden noch einen fördernden Einfluss auf die PARP-Spaltung und damit indirekt auf die Caspase-Aktivität hatte (Abbildung 3.4C). Dies lässt darauf schließen, dass auch die Caspase-3-vermittelte Prozessierung von $i\text{PLA}_2$ nicht durch BEL beeinflusst wird. Damit kann die nach BEL-Behandlung beobachtete verminderte Transmigration von THP-1 Monozyten tatsächlich auf eine verminderte LPC-Freisetzung zurückgeführt werden. Ob andere apoptotische Ereignisse durch die hier vorgenommene BEL-Behandlung beeinflusst wurden, kann damit jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass $i\text{PLA}_2$ während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert und aktiviert wird und aktive $i\text{PLA}_2\beta$ essentiell ist für die Generierung des löslichen Attraktionssignals LPC, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von $i\text{PLA}_2$ alleine ausreichend ist für die Produktion und Freisetzung von LPC. Um dies zu untersuchen, wurden in $\text{MCF7}_{\text{casp3}}$ Zellen die Vollängen-Form von $i\text{PLA}_2$ (aa1-806), die trunkierte aktive 26-kDa-Form $i\text{PLA}_2$ aa514-733 oder die N-terminalen Ankyrin-Motive ohne aktives Zentrum ($i\text{PLA}_2$ aa1-512) exprimiert. Dabei ließ sich beobachten, dass nach UV-Bestrahlung das chemotaktische Potential der Überstände dieser Zellen, und damit die Migration von THP-1 Monozyten, durch die Expression von $i\text{PLA}_2$ aa1-806 und noch deutlicher durch $i\text{PLA}_2$ aa514-733 gesteigert werden konnte (siehe Abbildung 3.5A). Dagegen hatte weder die Expression des 86-kDa-Vollängenproteins noch der aktiven 26-kDa-Form einen Einfluss auf das chemotaktische Potential von Überständen vitaler Zellen. Die Expression der 56 kDa großen N-terminalen Ankyrin-Region ohne aktives Zentrum (aa1-512) übte in keinem Fall einen Einfluss auf die Freisetzung von LPC aus. Dies widerspricht den Beobachtungen von Larsson et al., die eine hemmende Wirkung der Ankyrin-Motive auf die $i\text{PLA}_2$ -Aktivität vermuteten (Larsson et al., 1998). Wie bereits in Abschnitt 4.1

angesprochen, könnte eine mögliche Ursache für diesen Widerspruch in der Spaltung der $iPLA_2$ während der Apoptose liegen, wodurch eine möglichen inhibitorische Wirkung der Ankyrin-Motive aufgehoben werden könnte.

Die Beobachtung, dass aktive $iPLA_2\beta$ essentiell ist für die LPC-Generierung in apoptotischen Zellen, die Expression der aktiven 26-kDa- $iPLA_2$ jedoch nur in apoptotischen und nicht in vitalen Zellen zu einer gesteigerten Freisetzung des Attraktionssignals führt, warf die Frage auf, welche weiteren apoptotischen Ereignisse neben der Spaltung und Aktivierung von $iPLA_2$ für die LPC-Generierung und Freisetzung verantwortlich sind.

Ein mit der Apoptose eng assoziiertes Phänomen ist die Entstehung von oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS). Diese entstehen vor allem durch die Unterbrechung der Atmungskette während des Verlusts des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom c und können sowohl Proteine, Nukleinsäuren als auch Lipide peroxidieren (Chundra et al., 2000; Kagan et al., 2003; Raha und Robinson, 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass während der Apoptose insbesondere die spezifische Oxidation von Phosphatidylserin für dessen Externalisierung und die Erkennung durch Makrophagen wichtig ist (Kagan et al., 2002; Matura et al., 2002). Jedoch wurde auch oxidiertes Phosphatidylcholin auf apoptotischen Membranen nachgewiesen und belegt, dass es eine wichtige Rolle für die Erkennung apoptotischer Zellen durch Phagozyten spielt (Chang et al., 1999; Huber et al., 2002; Kagan et al., 2000). Zudem kommt es nach H_2O_2 -induzierter Apoptose zu einem erhöhten $iPLA_2$ -vermittelten Phospholipid-Um- und Abbau und dabei zu einem erhöhten intrazellulären Spiegel an Lysophosphatidylcholin und zu einer vermehrten Freisetzung von Arachidonsäure (Balboa und Balsinde, 2002; Perez et al., 2006; Perez et al., 2004). Ein Grund dafür ist, dass oxidierte Phospholipide, wahrscheinlich aufgrund ihrer veränderten sterischen Anordnung in der Membran, anfälliger für eine PLA_2 -vermittelte Hydrolyse zu sein scheinen als nicht-oxidierte. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob oxidativer Stress auch bei der Generierung des löslichen Phospholipid-Attraktionssignals LPC eine Rolle spielt. Durch die Inkubation von MCF7_{casp3} Zellen mit dem Antioxidanz α -Tocopherol, das zur Entgiftung von ROS beiträgt und somit Lipide vor Oxidation schützen kann, wurde die Freisetzung apoptotischer Attraktionssignale fast vollständig inhibiert (siehe Abschnitt 3.2.3). Die α -Tocopherol-behandelten Zellen zeigten dabei eine deutlich geringere Menge an Lipid-Hydroperoxiden (LOOH) als nicht-vorbehandelte apoptotische Zellen, die vergleichbar war mit der Menge an LOOH in vitalen Kontrollzellen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass neben der Prozessierung und Aktivierung von $iPLA_2$ auch die Lipidperoxidation durch ROS während der Apoptose ein bedeutender Faktor ist, der zur Generierung des Attraktionssignals LPC beiträgt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Frage, wie das Attraktionssignal LPC von apoptotischen Zellen freigesetzt wird. Die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) während der Apoptose als zentralem „eat-me“-Signal ist bereits seit langem bekannt, jedoch ist der genaue Externalisierungsmechanismus bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt. Durch den Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels während der Apoptose wird die Aminophospholipid-Translokase inaktiviert, die in vitalen Zellen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin (PE) nach innen transportiert. Gleichzeitig werden eine oder mehrere Lipid-Scramblasen oder ATP-abhängige Floppasen aktiviert, die verschiedene Phospholipide von der cytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran transportieren

(Beveris et al., 1999; Bratton et al., 1997; Williamson und Schlegel, 2002). Die Arbeitsgruppe von Chimini zeigte, dass für die apoptotische PS-Externalisierung besonders ein Mitglied der *ATP-binding cassette transporter* (ABC)-Familie, nämlich der ABCA1-Transporter, verantwortlich ist (Hamon et al., 2000). Auch vitale Makrophagen präsentieren PS auf ihrer Oberfläche, dabei scheint jedoch eher das ABC-Familienmitglied ABCA7 für die Externalisierung wichtig zu sein (Jehle et al., 2006). Dies könnte bedeuten, dass es zu CED-7 in *C. elegans* möglicherweise zwei homologe Säugerproteine geben könnte: ABCA7 in Makrophagen und ABCA1 in der Plasmamembran apoptotischer Zellen (siehe Abschnitt 1.5). Auch in vitalen Zellen kann die verstärkte Expression von ABCA1 zu einer mäßigen bis starken PS-Externalisierung führen; dies wurde unter anderem in murinen RAW264.7 Zellen, in MDCK II Zellen (Hunde-Nierenzelllinie) und HeLa-Zellen (humanes Zervixkarzinom) nachgewiesen (Alder-Baerens et al., 2005; Smith et al., 2002).

Gereinigtes humanes ABCA1 dagegen kann vor allem durch die Inkubation mit den Cholin-Phospholipiden PC und Sphingomyelin (SM) aktiviert werden, mit PS oder PE ist die gemessene ATPase-Aktivität wesentlich geringer (Takahashi et al., 2006). Zudem zeigt eine ganze Reihe von Veröffentlichungen, dass bei der Entstehung von HDL (*high density lipoprotein*)-Partikeln durch die Beladung von Apolipoprotein A1 mit Lipiden und Cholesterin die ABCA-Transporter ABCA1 und ABCA7 vor allem den Efflux von PC und SM regulieren (Abe-Dohmae et al., 2004; Hayashi et al., 2005; Wang et al., 2003; Wang und Tall, 2003). In der vorliegenden Arbeit wiesen Versuche mit dem ABCA-Inhibitor Glyburid darauf hin, dass diese Membranproteine auch eine wesentliche Rolle bei der Freisetzung des Attraktionssignals LPC während der Apoptose spielen (siehe Abschnitt 3.2.4). Der Vergleich der mRNA-Expression in MCF7_{casp3} Zellen ergab eine fast 50-fach stärkere Expression von ABCA7 gegenüber ABCA1, weshalb eine Beteiligung von ABCA7 an der LPC-Freisetzung wahrscheinlich erschien. Der spezifische *knock down* von ABCA7 in diesen Zellen hatte jedoch keinerlei Einfluss auf das chemotaktische Potential der Überstände nach Apoptose-Induktion, dagegen konnte die Freisetzung des Attraktionssignals durch den *knock down* von ABCA1 vollständig inhibiert werden (siehe Abschnitt 3.2.5). Die Analyse der ABCA1 mRNA- und Proteinexpression ergab, dass sowohl durch die Transfektion mit 50 als auch mit 100 nM spezifischem ABCA1-siRNA-Oligonukleotid eine deutliche Reduktion der ABCA1-Expression erzielt werden konnte und nur noch eine geringe Menge ABCA1 exprimiert wurde (Abbildung 3.8D). Weshalb die Freisetzung des Attraktionssignals trotz dieser zwar deutlich reduzierten aber immer noch detektierbaren Menge an ABCA1 vollständig gehemmt werden konnte, lässt sich nicht eindeutig sagen. Ein Erklärungsansatz wäre, dass ABCA1 in der Zellmembran wahrscheinlich erst als oligomerer Komplex seine Funktion als Lipidtransporter erfüllen kann (Denis et al., 2004) und diese Oligomerisierung nach dem *knock down* möglicherweise nicht mehr in ausreichendem Maß stattfinden kann. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse indirekt die Veröffentlichungen, in denen ABCA1 als Transporter für Cholin-Phospholipide beschrieben ist (Hayashi et al., 2005; Takahashi et al., 2006). Dass ABCA7 trotz der deutlichen mRNA-Expression nicht an der LPC-Freisetzung beteiligt ist könnte sich dadurch erklären lassen, dass ABCA7 zwar in vielen Geweben exprimiert wird, zum Teil jedoch unterschiedliche Funktionen zu haben scheint und trotz Expression nicht immer an der Zelloberfläche detektiert werden kann (Linsel-Nitschke et al., 2005). Aufgrund eines fehlenden Westernblot-Antikörpers konnte hier leider nicht untersucht werden, wie stark die ABCA7-Proteinexpression an der Plasmamembran tatsächlich war.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der ABCA1-Transporter während der Apoptose eine zentrale Rolle für die Freisetzung des löslichen Attraktionssignals LPC spielt. ABCA7 scheint dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf den LPC-Efflux von apoptotischen MCF7_{casp3} Zellen zu haben.

Um die bis hierher gewonnene Vorstellung der iPLA₂-vermittelten LPC-Produktion und der anschließenden Freisetzung durch ABCA1 weiter zu belegen, wurde im Folgenden versucht, dieses apoptotische Szenario durch Expression der aktiven 26-kDa-iPLA₂ und Aktivierung des ABCA1-Transporters durch Ionomycin-C-stimulierten Calcium-Influx in vitalen Zellen zu simulieren. Als Spezifitätskontrolle wurden ABCA1-*knock-down*-Zellen eingesetzt und die Zellen mit dem iPLA₂-Inhibitor BEL behandelt. Dabei wurde deutlich, dass ausschließlich Zellen, die aktive iPLA₂ und ABCA1 exprimierten auch in der Lage waren, Attraktionssignale freizusetzen (siehe Abschnitt 3.2.6). Wie groß der Einfluss der Lipidperoxidation in diesem Fall auf die LPC-Generierung ist, kann hier nicht eindeutig gesagt werden. Abbildung 3.6 zeigt, dass auch in vitalen Zellen Lipid-Hydroperoxide nachweisbar sind, jedoch keine LPC-Freisetzung stattfindet. Dies spricht dafür, dass möglicherweise auch in vitalen Zellen durch den ständigen Um- und Abbau oxidierter Phospholipide LPC entsteht, dass jedoch in vitalen, ruhenden Zellen der ABCA1-Transporter dieses LPC nicht aus der Zelle transportiert. Während der Apoptose kommt es somit wahrscheinlich sowohl durch die Prozessierung und Aktivierung der iPLA₂ als auch durch die verstärkte Lipid-Peroxidation zu einer deutlich stärkeren Generierung von LPC, das über den aktivierten ABCA1-Transporter von diesen Zellen freigesetzt werden kann. Der aus den hier gezeigten Ergebnissen abgeleitete Mechanismus der iPLA₂- und ABCA1-vermittelten Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals LPC ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

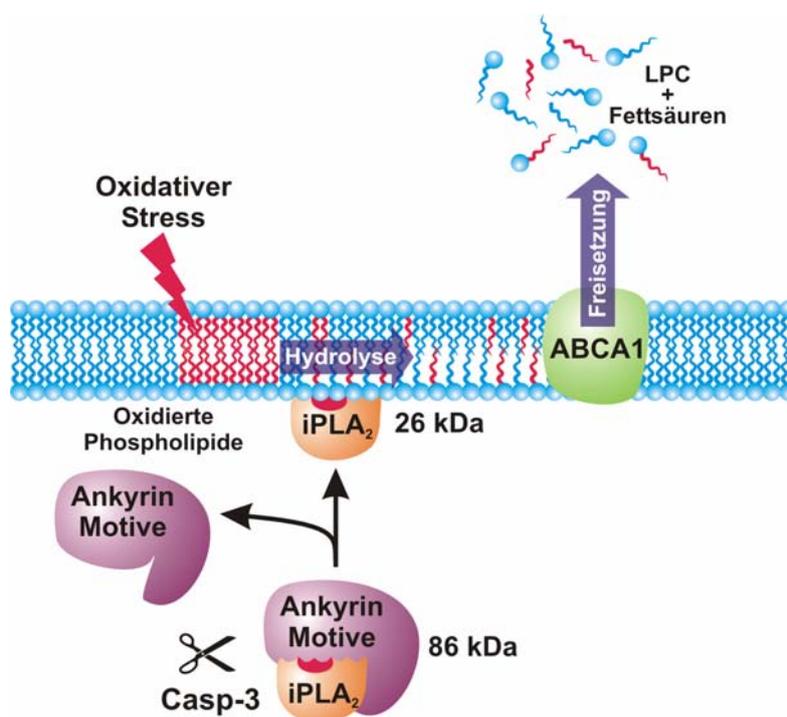


Abbildung 4.1: Modellvorstellung der Generierung und Freisetzung des löslichen Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose.

Während der Apoptose wird die 86 kDa große Vollformenform der iPLA₂ durch Caspase-3 prozessiert und dabei die N-terminalen Ankyrin-Motive und der C-Terminus abgespalten. Dadurch entsteht ein 26 kDa großes, aktiviertes iPLA₂-Fragment, das zur vermehrten Hydrolyse von Phosphatidylcholin und damit zur Generierung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin (LPC) führt. Zusätzlich entstehen während der Apoptose durch die Einwirkung von oxidativem Stress an der Zellmembran oxidierte Phospholipide, die verstärkt durch iPLA₂ gespalten werden können und damit zur LPC-Entstehung beitragen. Das an der Innenseite der Plasmamembran generierte LPC wird schließlich über den *ATP-binding cassette transporter ABCA1* freigesetzt, der während der Apoptose wahrscheinlich durch den Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels aktiviert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass iPLA₂β während der Apoptose durch Caspase-3 prozessiert und aktiviert wird. Gleichzeitig kommt es an der Zellmembran zu einer erhöhten Lipid-Peroxidation und damit insgesamt zur verstärkten iPLA₂-vermittelten Generierung von Lysophosphatidylcholin. Durch die Aktivierung des ABCA1-Transporters während der Apoptose kann LPC als lösliches Attraktionssignal freigesetzt werden. Bei diesem Prozess ist sowohl die Aktivität der iPLA₂ als auch eine ausreichende Expression und Aktivierung von ABCA1 essentiell. Zusätzlich scheint die Lipidperoxidation eine wichtige Rolle bei der Generierung von LPC zu spielen. Ob und in welchem Maße andere Faktoren, z.B. mögliche iPLA₂-Inhibitoren wie Calmodulin (Jenkins et al., 2001; Smani et al., 2004), oder apoptotische Ereignisse wie pH-Wert-Änderungen (Waibel et al., 2007), Einfluss auf die iPLA₂-Aktivität und die ABCA1-vermittelte Freisetzung von LPC haben, bleibt an dieser Stelle offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3 Die Migration von Monozyten auf das Attraktionssignal LPC wird durch den G2A-Rezeptor vermittelt

Die von Lauber et al. beschriebende Generierung des monozytären Attraktionssignals LPC (Lauber et al., 2003) konnte in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der iPLA₂-vermittelten Produktion und der Freisetzung durch den ABCA1-Transporter im Wesentlichen aufgeklärt werden (siehe Abschnitt 4.1 und 4.2). Wie von Kim et al. gezeigt, kann Lysophosphatidylcholin auch als „eat-me“-Signal auf der Oberfläche apoptotischer Zellen gebunden bleiben und nach der Rekrutierung von Komplementfaktoren wahrscheinlich über die entsprechenden Komplementrezeptoren von Phagozyten erkannt werden (Kim et al., 2002). Über die Rezeptoren, die für die Wirkung von löslichem LPC als „find-me“-Signal auf die Phagozyten verantwortlich sind und deren aktive Migration auslösen, ist bislang jedoch wenig bekannt. Folglich sollte diese Frage untersucht und die Beteiligung möglicher phagozytärer LPC-Rezeptoren näher betrachtet werden.

In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der G-Proteingekoppelte Rezeptor G2A maßgeblich an der durch das Attraktionssignal LPC vermittelten Migration der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 beteiligt ist (siehe 3.3). Diese Ergebnisse sind zum Teil übereinstimmend mit Arbeiten anderer Gruppen, die jedoch sehr kontrovers diskutiert werden. So musste die Veröffentlichung, in der LPC als unmittelbarer Ligand des G2A-Rezeptors identifiziert wurde (Kabarowski et al., 2001) aufgrund nicht-reproduzierbarer Bindungsstudien zurückgezogen werden (Witte et al., 2005). Jedoch zeigten nachfolgende Arbeiten, dass G2A durchaus an der LPC-vermittelten Migration von Lymphozyten und Makrophagen beteiligt ist (Radu et al., 2004; Yang et al., 2005). Zudem kann die von verschiedenen Gruppen für die Mitglieder der OGR1 (*orphan G protein-coupled receptor 1*)-Familie (G2A, GPR4, TDAG8 und OGR1) beschriebene Funktion als Protonensensor (Ishii et al., 2005; Ludwig et al., 2003; Murakami et al., 2004) für G2A inzwischen bezweifelt

werden, da verschiedene *G2A-knockout*-Zelllinien keine veränderte cAMP-Produktion nach extrazellulärer Protonengabe zeigen (Radu et al., 2005). Auch die in den Abschnitten 3.3.1 - 3.3.3 gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass G2A als Mitglied der OGR1-Familie mit der geringsten Homologie (Radu et al., 2005) eher eine Rolle bei der durch Lysophospholipide, wie LPC, vermittelten Zellmigration spielt.

Neben LPC als möglichem G2A-Liganden wurde erst vor kurzem beschrieben, dass auch oxidierte Fettsäuren Liganden des G2A-Rezeptors sind (Obinata et al., 2005). Die Autoren konnten zeigen, dass es mit einer Reihe oxidierter Fettsäuren in G2A-überexprimierenden Zellen zur intrazellulären Calcium-Mobilisierung, Abnahme des cAMP-Spiegels und Jun-Kinase(JNK)-Aktivierung kommt. Sie konnten jedoch keinen Anstieg des Calcium-Spiegels nach LPC-Stimulierung detektieren. Eine ERK-Phosphorylierung, wie sie für die LPC-vermittelte G2A-Aktivierung beschrieben ist (Yang et al., 2005), konnten Obinata et al. für oxidierte Fettsäuren dagegen nicht zeigen. Um eine mögliche Beteiligung oxidierter Fettsäuren an der chemotaktischen Aktivität apoptotischer Zellkulturüberstände zu untersuchen, wurden mit verschiedenen oxidierten Fettsäuren Transmigrationstests durchgeführt. Dabei konnte in keinem Fall die Migration von Monozyten stimuliert oder das chemotaktische Potential der Überstände durch oxidierte Fettsäuren neutralisiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte eine Beteiligung oxidierter Fettsäuren an der G2A-vermittelten Migration von Monozyten ausgeschlossen werden. Vielmehr könnte dies darauf hindeuten, dass LPC und oxidierte Fettsäuren in G2A-exprimierenden Zellen unterschiedliche Signalwege stimulieren. Obinata et al. folgerten aus ihren Versuchen, dass an der G2A-vermittelten Signaltransduktion oxidierter Fettsäuren sowohl die G_q - als auch die G_i -alpha-Untereinheit assoziierter G-Proteinen beteiligt ist. Dagegen wurde für LPC eine G_i -unabhängige, G2A- $G_{q/11}/G_{12/13}$ -vermittelte Migration von Monozyten beschrieben (Yang et al., 2005). Somit kommt es durch oxidierte Fettsäuren eher zur Calcium-Aktivierung, Abnahme des cAMP-Spiegels und JNK-Aktivierung (Obinata et al., 2005), wogegen LPC möglicherweise eher über Rho-Aktivierung und ERK-Phosphorylierung die Migration stimuliert. Da während der Apoptose $iPLA_2$ -vermittelt sowohl LPC als auch oxidierte Fettsäuren entstehen können, wären weitere Untersuchungen zu möglicherweise kooperativen Effekten beider Agonisten interessant.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LPC die Migration der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 G2A-abhängig induziert. Eine direkte Bindung von LPC an den G2A-Rezeptor scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da die von Kabarowski et al. 2001 veröffentlichten Daten, die eine direkte Bindung von LPC an G2A zeigten, zurückgezogen werden mussten (Kabarowski et al., 2001; Witte et al., 2005). Somit bleibt die Frage, ob LPC nicht eher indirekt über bislang nicht identifizierte Faktoren an den G2A-Rezeptor binden kann. Betrachtet man die unterschiedlichen „eat-me“-Signale auf der Oberfläche apoptotischer Zellen wird deutlich, dass Lipidsignale, wie z.B. Phosphatidylserin, zumeist indirekt über Brückenmoleküle an die zugehörigen phagozytären Rezeptoren binden (Lauber et al., 2004). Für membranständiges LPC konnte gezeigt werden, dass sowohl eine IgM-abhängige als auch eine IgM-unabhängige Rekrutierung von Komplementfaktoren erfolgt, die für die Eliminierung der Zellen wichtig ist (Kim et al., 2002). Deshalb ist es durchaus denkbar, dass auch zur LPC-vermittelten Migration von Monozyten Kofaktoren notwendig sind, die eine Bindung des Attraktionssignals an den G2A-Rezeptor ermöglichen. Eine alternative Möglichkeit, wie LPC die G2A-vermittelte Signaltransduktion regulieren kann, wurde von Wang et al. beschrieben.

Dabei induziert und stabilisiert LPC die G2A-Oberflächenexpression und kann somit eher indirekt die G2A-vermittelte ERK-Phosphorylierung und Zellmigration stimulieren (Wang et al., 2005).

Die in Abschnitt 3.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der G2A-Rezeptor äußerst wichtig für die LPC-vermittelte Migration von Monozyten ist. Jedoch konnte die durch Überstände apoptotischer Zellen stimulierte Migration von THP-1 Zellen nach dem *knock down* von G2A nicht vollständig inhibiert werden. Dies könnte daran liegen, dass der *knock down* zwar sehr effektiv war, jedoch immer noch eine geringe Menge G2A detektiert werden konnte. Eine andere Möglichkeit wäre die Beteiligung weiterer Rezeptoren, die hier jedoch zumindest für GPR4 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte, da der *GPR4-knock-down* keinen messbaren Effekt auf die Migrationsfähigkeit von THP-1 Monozyten hatte. Andere Gruppen zeigten, dass GPR4 durchaus an LPC- und Lysosphingomyelin-vermittelten Reaktionen beteiligt ist, jedoch nicht im Zusammenhang mit Zellmigration (Kim et al., 2005; Qiao et al., 2006). Außerdem konnte für GPR4 eine Rolle als Protonen-Sensor und weniger als LPC-Rezeptor bestätigt werden (Ludwig et al., 2003; Radu et al., 2005). Eine Beteiligung anderer Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und kann somit nicht ausgeschlossen werden. So ist bekannt, dass *Scavenger*-Rezeptoren sowohl oxidiertes LDL als auch LPC binden können und die Assoziation von Komplementfaktoren mit LPC die Bindung an Komplementrezeptoren vermittelt (Lauber et al., 2004).

Eine andere Erklärung dafür, dass der *knock down* von G2A nicht zu einer völligen Inhibierung der durch Überstände apoptotischer Zellen stimulierten Migrationsfähigkeit von THP-1 Zellen führte (Abbildung 3.12A), wären zusätzliche „find-me“-Signale, die unabhängig von G2A die Zellmigration stimulieren. Dafür würde auch die Beobachtung sprechen, dass nach dem *G2A-knock-down* die Migration auf gereinigtes LPC komplett unterdrückt werden konnte (Abbildung 3.12B). Die Existenz anderer chemotaktisch aktiver Signale als LPC in den Überständen apoptotischer Zellen kann hier nicht ausgeschlossen werden. So finden sich in der Literatur einige Hinweise auf andere apoptotische Attraktionssignale wie das S19 ribosomale Protein, die humane Tyrosyl-tRNA-Synthetase und Thrombospondin-1, für die ebenfalls eine chemotaktische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Horino et al., 1998; Moodley et al., 2003; Wakasugi und Schimmel, 1999).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der G2A-Rezeptor maßgeblich verantwortlich ist für die Migration der monozytären Zelllinien THP-1 und U937 auf das Attraktionssignal LPC. Dass G2A tatsächlich eine äußerst wichtige Rolle bei der Eliminierung apoptotischer Zellen spielt, konnte zudem von Le et al. in *in vivo*-Studien nachgewiesen werden. Dabei entwickeln *G2A-knockout*-Mäuse ein Multiorgan-Autoimmunsyndrom, das viele Parallelen zum humanen systemischen Lupus erythematodes aufweist (Le et al., 2001). Dagegen scheint GPR4 in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten System keine wesentliche Rolle zu spielen. Ob andere Rezeptoren an der LPC-vermittelten Migration beteiligt sind oder neben LPC weitere chemotaktisch aktive Signale die Migration stimulieren kann hier nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Rolle von Annexin I bei der Eliminierung apoptotischer Zellen

Für Annexin I, ein 38 kDa großes, Calcium- und Phospholipid-bindendes Protein, sind verschiedene anti-inflammatorische Funktionen beschrieben worden: So ist die Annexin-I-Expression durch

Glucocorticoide induzierbar, wodurch unter anderem die Extravasation von Monozyten und Neutrophilen in entzündete Gewebe inhibiert werden kann (Perretti et al., 2002; Solito et al., 2000). Zudem wurde Annexin I als Inhibitor der Calcium-abhängigen Phospholipase A₂ (cPLA₂) identifiziert (Frey et al., 1999; Kim et al., 2001; Solito et al., 1998), der die Freisetzung von Arachidonsäure und damit die Synthese von potentiell pro-inflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen unterdrückt (Wu et al., 2000b). Verschiedene aktuelle Veröffentlichungen zeigen außerdem, dass Annexin I eine wichtige Rolle bei der Phagozytose apoptotischer Zellen zu spielen scheint (Arur et al., 2003; Fan et al., 2004; Maderna et al., 2005). Im Hinblick auf die iPLA₂-vermittelte Generierung des Attraktionssignals LPC wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein möglicher inhibitorischer Einfluss von Annexin I untersucht. Wie bereits in Abschnitt 4.1 besprochen, zeigte sich jedoch, dass Annexin I in diesem Zusammenhang offensichtlich nicht als iPLA₂-Inhibitor wirkt und eine erhöhte Annexin-I-Expression keine Auswirkungen auf die iPLA₂-vermittelte Generierung apoptotischer Attraktionssignale hatte (siehe Abbildung 3.14). Deshalb wurde im Folgenden die Funktion von Annexin I bei der Eliminierung apoptotischer Zellen näher untersucht.

Im Verlauf dieser Untersuchungen zeigte sich, dass Annexin I unabhängig vom verwendeten Apoptose-Stimulus von apoptotischen Zellen externalisiert wurde. Dabei war die beobachtete Externalisierung Zelltyp-abhängig und ging mit einer Prozessierung von Annexin I einher, die sich in der Westernblot-Analyse anhand eines um etwa 3 kDa verkürzten Annexin-Fragments darstellen ließ (siehe Abschnitte 3.4.2 - 3.4.4). In der Literatur wird eine Annexin-I-Oberflächenexposition für verschiedene Zelllinien beschrieben, dabei sollte jedoch zwischen der Annexin-I-Externalisierung apoptotischer Zellen und der vitaler Monozyten oder Makrophagen unterschieden werden. Arur et al. zeigten, dass nach Apoptose-Induktion mit anti-CD95-Antikörper sowohl Jurkat Zellen als auch primäre Muskelzellen eine deutliche Annexin-I-Oberflächenfärbung aufwiesen und schlossen daraus, dass die Annexin-I-Externalisierung ein generelles apoptotisches Phänomen sein könnte (Arur et al., 2003). Dass zwar apoptotische Jurkat Zellen Annexin I externalisieren, dies jedoch nicht grundsätzlich auf sterbende Zellen zutrifft, zeigte dagegen die Arbeit von Fan et al., in der neben Jurkat Zellen auch primäre Thymozyten untersucht wurden (Fan et al., 2004). In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch den Vergleich von 7 verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, dass lediglich die verwandten T-lymphozytären Zelllinien Jurkat, Molt4 und primäre PHA-Blasten während der Apoptose eine Annexin-I-Oberflächenexposition aufwiesen, die in den vitalen Zellen nicht nachweisbar war. Für die restlichen 4 Zelllinien konnte keine Annexin-I-Externalisierung nachgewiesen werden, obwohl die meisten deutlich Annexin I exprimierten (siehe Abbildung 3.17). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Annexin-I-Externalisierung apoptotischer Zellen zwar Apoptosestimulus-unabhängig, jedoch Zelltyp-spezifisch ist.

Abgesehen von dieser Apoptose-abhängigen Annexin-I-Externalisierung ist auch eine Reihe vitaler Zellen in der Lage, Annexin I konstitutiv oder nach Stimulation zu externalisieren. So zeigen Monozyten nach Glucocorticoid-Stimulation eine deutliche Annexin-I-Oberflächenexpression, die ihre Extravasation in entzündete Gewebe inhibiert (Perretti et al., 2002; Solito et al., 2000). Ausdifferenzierte Makrophagen, wie U937 oder J774 und humane, aus primären Monozyten generierte Makrophagen, exprimieren Annexin I sogar konstitutiv auf ihrer Oberfläche (Fan et al., 2004; Maderna et al., 2005). Auf vitalen Makrophagen konnte zudem ein weiteres Mitglied der Annexin-Familie nachgewiesen

werden, nämlich Annexin II (Fan et al., 2004), während die Annexin-Externalisierung apoptotischer Zellen innerhalb der Annexin-Familie eher auf Annexin I beschränkt zu sein scheint. Die hier gezeigte Oberflächenfärbung apoptotischer Jurkat Zellen gegen Annexin II und Annexin VII ergab, dass diese Annexine nicht externalisiert werden, obwohl sie von Jurkat Zellen exprimiert werden (Abbildung 3.16). Die Arbeit von Arur et al. belegt zudem, dass auch Annexin IV und Annexin VI im Gegensatz zu Annexin I nicht verstärkt in der Membranfraktion apoptotischer Jurkat Zellen nachweisbar sind (Arur et al., 2003).

Die Externalisierung von Annexin I in apoptotischen Jurkat Zellen findet zu einem Zeitpunkt statt, an dem ein großer Anteil der Zellpopulation bereits Propidiumiodid-positiv ist und sich somit in einem späten Stadium der Apoptose befindet (siehe Abbildung 3.15 und Arur et al., 2003). Da Annexine über ihre Annexin-Boxen Calcium-abhängig Phospholipide binden können, stellte sich die Frage, wie Annexin I an die Zelloberfläche gebunden ist. Die Untersuchungen von Fan und Arur et al. zeigten, dass die Annexin-I-Exposition auf apoptotischen Zellen Calcium-abhängig ist (Fan et al., 2004) und Annexin I mit Phosphatidylserin ko-lokalisiert ist (Arur et al., 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da eine Annexin-I-Oberflächenfärbung nur in Anwesenheit von Calcium möglich war (Abbildung 3.18A) und sich Annexin I nur mit Phosphatidylserin-haltigen Micellen spezifisch präzipitieren ließ; ohne Calcium oder mit Micellen, die nur Phosphatidylcholin enthielten, war dies nicht möglich (Abbildung 3.18D). Dass Annexin I über die Annexin-Boxen Calcium-abhängig an PS bindet, bestätigte sich durch weitere Versuche, in denen nur das Volllängenprotein (AnxI aa1-346) und die N-terminal trunkierte Form (aa47-346) in Anwesenheit von Calcium an die Oberfläche apoptotischer Jurkat Zellen oder vitaler, transient PS-externalisierender Jurkat Zellen binden konnten. Der N-Terminus von Annexin I (aa1-46), der vor den Annexin-Boxen trunkiert wurde, konnte hingegen nicht an die Oberfläche dieser Zellen gebunden werden (Abbildung 3.18C und E). Solito et al. beschrieben für vitale U937 Zellen zwei mögliche Arten einer Annexin-I-Oberflächenbindung: eine Bindung mit niedriger Affinität, die durch EGTA inhibierbar ist und eine zweite, hochaffine Bindung, auf die eine Behandlung mit EGTA keinen Einfluss hat (Solito et al., 2000). Auch auf vitalen Makrophagen scheint die Bindung von Annexin I und II nicht auf dieselbe Weise zu erfolgen wie auf apoptotischen Zellen, denn obwohl differenzierte Makrophagen PS auf ihrer Oberfläche präsentieren, ist die Annexin-I-Bindung Calcium-unabhängig und kann anders als bei apoptotischen Jurkat Zellen nicht durch Waschen mit EGTA-haltigem Puffer inhibiert werden (Fan et al., 2004). Dies spricht dafür, dass die Annexin-I-Bindung auf apoptotischen und vitalen Zellen unterschiedlicher Natur ist und während der Apoptose Calcium-abhängig über die Annexin-Boxen an externalisiertes Phosphatidylserin erfolgt, wohingegen die Bindung auf vitalen Zellen Calcium-unabhängig ist und möglicherweise über andere Regionen als die Phospholipid- und Calcium-bindenden Annexin-Boxen stattfindet.

Über den Externalisierungsmechanismus von Annexin I während der Apoptose ist lediglich bekannt, dass er sowohl Calcium- als auch Caspase-abhängig ist (Arur et al., 2003). Welche Transporter jedoch für die Translokation von der cytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Der klassische sekretorische Externalisierungsweg über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat konnte durch Versuche mit dem Proteinexport-Inhibitor Brefeldin A ausgeschlossen werden, da er die Annexin-I-Externalisierung nicht inhibierte (Daten nicht gezeigt); zudem besitzt Annexin I keine N-terminale Signalsequenz für diesen

Sekretionsweg. Für vitale TtT/GF-Zellen (Follikulo-Stellat Zelllinie) konnte nachgewiesen werden, dass für die Glucocorticoid-induzierte Annexin-I-Externalisierung eine Phosphorylierung von Annexin I benötigt wird (Solito et al., 2006). Weitere Arbeiten zeigten, dass die Externalisierung in diesen Zellen von der Expression des ABC (*ATP-binding cassette transporter*)-Transporters ABCA1 abhängig ist und durch die Inhibition oder den *knock down* von ABCA1 verhindert werden kann. Durch die Expression von ABCA1 in Zelllinien, die keine endogene ABCA1-Expression zeigen, kann die Annexin-I-Externalisierung induziert werden. Zudem konnte eine ABCA1-Expression in vielen Zelllinien nachgewiesen werden, die nach Glucocorticoid-Stimulation Annexin I externalisieren (Chapman et al., 2003; Omer et al., 2006). Dies erscheint umso interessanter, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die ausreichende Expression und Aktivität von ABCA1 für die Freisetzung des Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin während der Apoptose essentiell ist (siehe Abschnitt 3.2.5). Zudem beschrieben Hamon et al. und Alder-Baerens et al., dass die ABCA1-Expression verschiedener vitaler Zellen entscheidend für deren Fähigkeit zur PS-Externalisierung ist (Alder-Baerens et al., 2005; Hamon et al., 2000). Somit war es vorstellbar, dass die apoptotische Annexin-I-Externalisierung über die Calcium-abhängige Assoziation mit Phospholipiden wie PS und/oder LPC ablaufen könnte. Jedoch zeigten weitere im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche, dass die Inkubation mit dem ABCA-Inhibitor Glyburid keinen hemmenden Effekt auf die Annexin-I-Externalisierung apoptotischer Jurkat Zellen hatte und lediglich durch Hemmung der Caspase-Aktivität die Annexin-I-Exposition verhindert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte eine ABCA1-abhängige Annexin-I-Externalisierung bisher nur in vitalen Zellen gezeigt werden (Omer et al., 2006) und die unterschiedliche Art der Annexin-I-Bindung auf apoptotischen und vitalen Zellen (siehe oben) könnte zusätzlich für verschiedene Externalisierungswege sprechen. Somit kann zum jetzigen Zeitpunkt zusammenfassend gesagt werden, dass die Annexin-I-Translokation in apoptotischen Zellen sowohl Caspase- als auch Calcium-abhängig ist, jedoch zur Aufklärung des Externalisierungsmechanismus weitere Versuche notwendig sind. Außerdem sollte die in Abschnitt 3.4.4 beobachtete Prozessierung von Annexin I in diesem Zusammenhang näher untersucht werden, da sie nur in Zellen auftrat, die eine Annexin-I-Oberflächenexposition zeigten.

Nachdem in Übereinstimmung mit den Veröffentlichungen von Arur und Fan et al. eine Calcium-abhängige Bindung von Annexin I an die Phosphatidylserin-reiche Oberfläche apoptotischer Jurkat Zellen gezeigt werden konnte, sollte im Weiteren näher auf die Funktion von Annexin I bei der Phagozytose apoptotischer Zellen eingegangen werden. Hierzu wurden apoptotische Jurkat Zellen mit EGTA- oder Calciumchlorid-haltigem Puffer gewaschen und in Phagozytostests mit ausdifferenzierten THP-1 und U937 Makrophagen eingesetzt. Der Vergleich ergab, dass das Abwaschen von Annexin I mit EGTA keinen Einfluss auf die Phagozytose dieser Zellen hatte (siehe Abbildung 3.19A). Dies widerspricht den Ergebnissen von Fan et al., die nach dem Abwaschen von Annexin I von apoptotischen Jurkat Zellen eine um etwa 50 % reduzierte Phagozytose durch J774 Makrophagen messen konnten (Fan et al., 2004). Ein Grund für diesen Widerspruch könnte sein, dass nach dem Waschen der apoptotischen Zellen während der Phagozytose-Tests möglicherweise noch Annexin I externalisiert wurde und deshalb bei längerer Inkubationsdauer der Effekt der EGTA-Vorbehandlung reversibel sein könnte. Fan et al. beobachteten eine inhibierte Phagozytose durch das Abwaschen von Annexin I nach 30-minütiger Ko-Inkubation von apoptotischen Zellen und

Makrophagen, spätere Zeitpunkte sind in dieser Veröffentlichung nicht angegeben. In der vorliegenden Arbeit war nach 30 bzw. 45 Minuten (THP-1 oder U937 Makrophagen) kein Unterschied zwischen EGTA-behandelten und nicht behandelten Zellen sichtbar, jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Zahl phagozytierter Jurkat Zellen und der Phagozytose-Index sehr gering. Um die Annexin-I-Externalisierung während der Apoptose effizienter reduzieren zu können, wurde für weitere Tests in Jurkat Zellen die Annexin-I-Expression durch die Verwendung spezifischer siRNA-Oligonukleotide inhibiert. Jedoch konnte auch nach dem *knock down* von Annexin I keine eingeschränkte Phagozytose dieser Zellen durch THP-1- und U937-Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 3.19B). Die Westernblot-Analyse der siRNA-behandelten Jurkat Zellen zeigte, dass der Annexin-I-*knock-down* äußerst effektiv war und nur noch eine sehr geringe Annexin-I-Expression detektierbar war (siehe Abbildung 3.19C). In der Arbeit von Arur et al. konnte durch den Annexin-I-*knock-down* die Anheftung apoptotischer Jurkat Zellen an Endothelzellen um etwa die Hälfte reduziert werden, im Westernblot war hier kein Annexin-I-Signal mehr nachweisbar (Arur et al., 2003). Somit wäre eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse, dass trotz des effektiven *knock downs* die Restexpression von Annexin I ausreichend sein könnte, um eine Funktion bei der Phagozytose dieser Zellen zu erfüllen. Ein anderer Erklärungsansatz ergibt sich aus der Tatsache, dass es neben Annexin I weitere Proteine gibt, die als Brückenmoleküle der phagozytotischen Synapse die Interaktion von apoptotischer Zelle und Phagozyt vermitteln können. Dabei unterliegen die verschiedenen „eat-me“-Signale und die zugehörigen Brückenmoleküle einer gewissen Redundanz (siehe Abschnitt 1.5). Besonders in Hinblick auf die Tatsache, dass spät-apoptotische Zellen verwendet wurden, könnten möglicherweise Proteine wie z.B. MFG-E8 (Milk-fat-globule-EGF-factor 8), Gas6 (growth arrest-specific 6), β 2-GP1 (β 2-glycoprotein-1) oder Protein S, die als PS-bindende Brückenmoleküle während der Phagozytose beschrieben sind (Übersicht: Lauber et al., 2004), den Funktionsausfall von Annexin I kompensieren. Ob diese Proteine jedoch in dem hier verwendeten System eine Rolle spielen, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Da apoptotische Jurkat Zellen erst zu einem Zeitpunkt Annexin I externalisieren, an dem sie bereits PI-positiv sind (siehe oben) und in diesem Szenario möglicherweise bereits eine ganze Reihe weiterer „eat-me“-Signale eine Rolle spielen, sollte die Funktion von Annexin I während der Phagozytose in einem anderen Zellsystem untersucht werden. Dazu wurden früh-apoptotische THP-1 Zellen als Beutezellen verwendet, da diese eine sehr schwache endogene Annexin-I-Expression zeigen und während der Apoptose kein Annexin I externalisieren (siehe Abbildung 3.17). Die Zellen wurden in einem frühen Stadium der Apoptose für die Versuche eingesetzt, in dem sie bereits PS externalisieren, jedoch noch PI-negativ sind. Vor den Phagozytostests wurden die apoptotischen, PS-externalisierenden THP-1 Zellen mit verschiedenen humanen, rekombinanten Annexin-I-Konstrukten oder BSA inkubiert und danach an ausdifferenzierte THP-1- oder U937-Makrophagen verfüttert. Sowohl die Vollängenform von Annexin I (aa1-346) als auch das N-terminal trunkierte Konstrukt aa47-346 stimulierten die Phagozytose sehr deutlich, während eine Prä-Inkubation mit dem N-Terminus (Anxl aa1-46) oder BSA keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer THP-1 Zellen hatte (Abbildung 3.20). Somit kann gesagt werden, dass Annexin I durchaus einen Stimulus für die Phagozytose apoptotischer Zellen darstellt. Die Relevanz von Annexin I in diesem Prozess könnte

dabei möglicherweise vom Stadium der Apoptose abhängig sein und davon, ob und welche anderen PS-bindenden Proteine von den Zellen exprimiert und externalisiert werden. Dass die Annexin-I-Externalisierung nicht nur auf der Seite der sterbenden Zelle wichtig ist sondern auch für die Funktion von Makrophagen selbst, zeigen mehrere Veröffentlichungen. Durch die Blockierung von Annexin I auf verschiedenen Makrophagen kann die Phagozytose apoptotischer Thymozyten, die selbst kein Annexin I externalisieren, inhibiert werden (Fan et al., 2004). Außerdem zeigen Makrophagen aus Annexin-I-*knockout*-Mäusen eine deutlich eingeschränkte Phagozytose-Kapazität und produzieren nach Stimulation mehr pro-inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E₂, TNF α oder Interleukin-6 im Vergleich mit Zellen aus Annexin-I^{+/+}-Mäusen (Yona et al., 2004; Yona et al., 2006).

Auch wenn der N-Terminus von Annexin I aufgrund der fehlenden Phospholipid-Bindungsmotive nicht direkt an die PS-reiche Oberfläche apoptotischer Zellen binden kann und somit keinen Einfluss auf die Phagozytose apoptotischer THP-1 Zellen hatte (siehe oben), zeigten Maderna et al., dass die Prä-Inkubation von Makrophagen mit dem N-terminalen Annexin-I-Peptid aa1-26 ebenso wie die Prä-Inkubation mit Vollängenprotein zu einer verstärkten Phagozytose apoptotischer PMN-Zellen führt (Maderna et al., 2005). Zudem kann das Annexin-I-Peptid aa1-25 die Migration von Granulozyten und Monozyten über die Formyl-Peptid-Rezeptoren FPR, FPRL-1 und FPRL-2 stimulieren (Ernst et al., 2004). Hayhoe et al. zeigten, dass die Inhibierung der transendothelialen Migration polymorphonukleärer Leukozyten durch das Vollängenprotein und das N-terminale Peptid aa2-26 auf unterschiedliche Weise abläuft und Vollängen-Annexin-I nur über den FPR-Rezeptor an Endothelzellen binden kann, während Annexin I aa2-26 sowohl über FPR als auch über FPRL-1/ALX die ERK-Phosphorylierung dieser Zellen stimuliert (Hayhoe et al., 2006). Im Zusammenhang mit der transendothelialen Migration wurde zudem beobachtet, dass Annexin I auf der Zelloberfläche an $\alpha_4\beta_1$ -Intergrin binden kann und dadurch die Anheftung an Endothelzellen inhibiert (Solito et al., 2000). Über den oder die Rezeptoren, die für die Erkennung von auf apoptotischen Zellen gebundenem Annexin I verantwortlich sind, ist wenig bekannt. Die Arbeit von Arur et al. zeigt, dass die Expression des Phosphatidylserin-Rezeptors (PSR) und die Bildung von PSR-*Clustern* in die Phagozytose von Annexin-I-exprimierenden apoptotischen Zellen involviert ist (Arur et al., 2003). Arur et al. verwendeten in ihrer Arbeit Expressionskonstrukte für den PS-Rezeptor, die ausgehend von der Identifizierung und Klonierung des PS-Rezeptors durch die Arbeitsgruppe von Henson hergestellt wurden (Fadok et al., 2000). Jedoch kann inzwischen bezweifelt werden, dass das von Fadok et al. identifizierte Gen tatsächlich für einen PS-Rezeptor auf der Zelloberfläche kodiert (Williamson und Schlegel, 2004). Neuere Arbeiten zeigen, dass das Produkt des *psr*-Gens vielmehr ein nukleäres Protein zu sein scheint, das während der Entwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (Bose et al., 2004; Cikala et al., 2004; Cui et al., 2004). Deshalb ist die Identität eines möglichen PS-Rezeptors, der die Wirkung von Annexin I auf Seite der Phagozyten vermittelt, weiterhin unklar. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass eine Reihe von Rezeptoren an den verschiedenen anti-inflammatorischen Funktionen von Annexin I beteiligt ist. Ebenso wie es bei vitalen und apoptotischen Zellen unterschiedliche Externalisierungsmechanismen und Bindungsarten für Annexin I zu geben scheint, ist es vorstellbar, dass für Annexin I als „eat-me“-Signal der phagozytotischen Synapse andere Rezeptoren eine Rolle spielen als z.B. bei der transendothelialen Migration. Genauso könnte

die Funktion von Annexin I als Phagozytosestimulus vom Muster der Rezeptorexpression der jeweils beteiligten Makrophagenpopulation abhängen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Annexin I unabhängig vom verwendeten Apoptose-Stimulus externalisiert werden kann und Calcium-abhängig über die Annexin-Boxen an ebenfalls externalisiertes Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen bindet. Dadurch kann Annexin I die Eliminierung dieser Zellen durch professionelle Phagozyten stimulieren.

5 Zusammenfassung

Die effiziente Eliminierung apoptotischer Zellen durch benachbarte Zellen oder professionelle Phagozyten ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase in mehrzelligen Organismen. Dazu werden von den apoptotischen Zellen verschiedene Phagozytose- oder „eat-me“-Signale auf der Oberfläche präsentiert, die für die Erkennung und Internalisierung entscheidend sind. Insbesondere in höheren Organismen sind die sterbenden Zellen und die Phagozyten jedoch oft nicht direkt nebeneinander lokalisiert; deshalb kommt hier der Freisetzung von löslichen Attraktionssignalen eine besondere Bedeutung zu. Als ein solches „find-me“-Signal konnte Lysophosphatidylcholin (LPC) identifiziert werden, das durch die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin mittels der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂) entsteht. Dabei wird die iPLA₂ während der Apoptose Caspase-3-abhängig gespalten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung von iPLA₂ direkt durch Caspase-3 geschieht und tatsächlich zu deren Aktivierung führt. Die aktive iPLA₂ ist dabei essentiell für die Produktion des Phospholipid-„find-me“-Signals LPC in apoptotischen Zellen. Da die Expression der aktiven Form von iPLA₂ in vitalen Zellen jedoch nicht zu einer Freisetzung des Attraktionssignals führte, musste angenommen werden, dass weitere apoptotische Ereignisse an der Generierung und dem Export des Attraktionssignals LPC beteiligt sind. Es zeigte sich, dass die Oxidation von Membranlipiden, wie Phosphatidylcholin, durch reaktive Sauerstoffverbindungen während der Apoptose ein zusätzlicher Faktor ist, der zur verstärkten Produktion von LPC beiträgt - vermutlich weil peroxidierte Lipide anfälliger für eine PLA₂-vermittelte hydrolytische Spaltung sind als nicht-oxidierte. Weitere Untersuchungen zum genauen Exportmechanismus von LPC ergaben, dass das ABC (*ATP-binding cassette transporter*)-Familienmitglied ABCA1 essentiell für die Freisetzung des Attraktionssignals während der Apoptose ist. Somit konnten mit der Lipidoxidation und dem ABCA1-vermittelten LPC-Export weitere wichtige Elemente der LPC-Produktion und anschließenden Freisetzung dieses „find-me“-Signals während der Apoptose charakterisiert werden. Ob dieser mehrschrittige Prozess durch weitere Faktoren, wie z.B. mögliche Inhibitoren oder pH-Wert-Änderungen zusätzlich beeinflusst wird, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden und wird sich in zukünftigen Untersuchungen zeigen.

Nachdem die Generierung und Freisetzung des Attraktionssignals LPC näher aufgeklärt werden konnte, stellte sich die Frage, welche Rezeptoren die Wirkung von LPC auf den Phagozyten vermitteln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dabei gezeigt werden, dass der G-Proteingekoppelte Rezeptor G2A verantwortlich ist für die Migration monozytärer Zellen auf das Attraktionssignal LPC. Eine Beteiligung des GPR4-Rezeptors an diesem Prozess konnte dagegen ausgeschlossen werden. Die molekularen Mechanismen, die letztendlich zur LPC-stimulierten, G2A-vermittelten Migration führen, sind weitgehend unbekannt und müssen durch künftige Untersuchungen aufgeklärt werden. Auch eine Beteiligung anderer Rezeptoren an der LPC-vermittelten Anlockung von Phagozyten kann hier nicht ausgeschlossen werden. Es wäre auch denkbar, dass neben LPC weitere chemotaktisch aktive Signale in diesen Vorgang involviert sind. Betrachtet man die Vielzahl an „eat-me“-Signalen auf der Oberfläche apoptotischer Zellen scheint es durchaus vorstellbar, dass auch mehr als ein „find-me“-Signal an der Anlockung von Phagozyten beteiligt ist. Zudem finden sich einige Hinweise auf chemotaktisch aktive Proteine in der Literatur. Ob diese oder weitere Faktoren im Zusammenhang mit der LPC-vermittelten Chemotaxis monozytärer Zellen stehen, ist bis jetzt jedoch völlig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Dass apoptotische Zellen verschiedene „eat-me“-Signale auf ihrer Oberfläche präsentieren, ist seit längerem bekannt. Dabei kann die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten direkt oder indirekt über Brückenmoleküle stattfinden. Insgesamt führt dieser Kontakt zur Ausbildung der so genannten phagozytotischen Synapse, die entscheidend für die Erkennung und Internalisierung der sterbenden Zelle ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang die Funktion des Calcium- und Phospholipid-bindenden Proteins Annexin I näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass Annexin I zwar unabhängig vom verwendeten Apoptose-Stimulus externalisiert wird, diese Externalisierung jedoch kein generelles apoptotisches Phänomen sondern Zelltyp-abhängig ist. Die Bindung von Annexin I auf der Oberfläche der sterbenden Zelle erfolgt Calcium-abhängig über die Annexin-Boxen an ebenfalls externalisiertes Phosphatidylserin, das ein zentrales Phagozytose-Signal darstellt. Dadurch kann Annexin I die Eliminierung dieser Zellen durch professionelle Phagozyten stimulieren und erfüllt somit die Funktion eines Brückenmoleküls in der phagozytotischen Synapse. Darüber, wie Annexin I dabei genau an den Phagozyten bindet, kann nur spekuliert werden. Im Zusammenhang mit weiteren Funktionen von Annexin I sind verschiedene Rezeptoren beschrieben, mit denen Annexin I interagieren kann, jedoch ist unklar, ob diese auch bei der Phagozytose eine Rolle spielen. Es wäre auch denkbar, dass Annexin I apoptotische Zellen und Phagozyten über Phosphatidylserin vernetzt, das nicht nur von sterbenden Zellen sondern auch von Makrophagen externalisiert wird. Zudem ist eine Oberflächenexposition von Annexin I auch für Phagozyten beschrieben, wodurch es über eine homophile Interaktion zweier Annexin-I-Moleküle zum Kontakt zwischen Phagozyt und Beutezelle kommen könnte.

Abschließend sollte betont werden, dass die hier untersuchten Phänomene wichtige Schritte bei der effizienten Eliminierung apoptotischer Zellen darstellen. Die physiologische Relevanz dieser Vorgänge liegt darin, dass der apoptotische Zelltod, im Gegensatz zur Nekrose, in allen Schritten einer strengen Kontrolle unterliegt und ohne schädigende Nebenwirkungen für den Gesamtorganismus abläuft. Ist dieser komplexe, mehrstufige Prozess gestört, können nicht-eliminierte apoptotische Zellen zur Quelle für inflammatorische Reaktionen werden. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass sowohl Defekte bei der Anlockung von Phagozyten als auch bei der Erkennung und Internalisierung durch „eat-me“-Signale und der anschließenden Degradation der apoptotischen Zellen Ursache für die Entwicklung schwerer Autoimmunerkrankungen sein können. Auch die Entstehung des humanen systemischen Lupus erythematoses und von rheumatoider Arthritis wird inzwischen mit der unzureichenden Eliminierung apoptotischer Zellen in Zusammenhang gebracht.

6 Literatur

- Abe-Dohmae, S., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K., Ueda, K., Yokoyama, S. (2004). Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J Biol Chem* 279, 604-611.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Ackermann, E. J., Kempner, E. S., Dennis, E. A. (1994). Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 269, 9227-9233.
- Adams, J. M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66.
- Adrain, C., Slee, E. A., Harte, M. T., Martin, S. J. (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274, 20855-20860.
- Alder-Baerens, N., Muller, P., Pohl, A., Korte, T., Hamon, Y., Chimini, G., Pomorski, T., Herrmann, A. (2005). Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *J Biol Chem* 280, 26321-26329.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921.
- 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.
- Asano, K., Miwa, M., Miwa, K., Hanayama, R., Nagase, H., Nagata, S., Tanaka, M. (2004). Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *J Exp Med* 200, 459-467.
- Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I. (2000). Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2 α inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem* 275, 18248-18258.
- Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., Kudo, I. (1998). Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem* 273, 13870-13877.
- Balasubramanian, K., Chandra, J., Schroit, A. J. (1997). Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 272, 31113-31117.
- Balboa, M. A., Balsinde, J. (2002). Involvement of calcium-independent phospholipase A2 in hydrogen peroxide-induced accumulation of free fatty acids in human U937 cells. *J Biol Chem* 277, 40384-40389.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Beutler, B., van Huffel, C. (1994). Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 264, 667-668.
- Bevens, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., Zwaal, R. F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439, 317-330.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Borisenko, G. G., Iverson, S. L., Ahlberg, S., Kagan, V. E., Fadeel, B. (2004). Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8) binds to oxidized phosphatidylserine: implications for macrophage clearance of apoptotic cells. *Cell Death Differ* 11, 943-945.
- Bose, J., Gruber, A. 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. (1998). C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Exp Clin Immunogenet* 15, 231-234.
- Botto, M., Walport, M. J. (2002). C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* 205, 395-406.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
- Byrne, A., Reen, D. J. (2002). Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 168, 1968-1977.
- Cain, K., Bratton, S. B., Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-214.
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., Cohen, G. M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.
- 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. *J Exp Med* 179, 1317-1330.
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104, 769-780.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
- 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.
- 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.
- Cherla, R. P., Ganju, R. K. (2001). Stromal cell-derived factor 1 alpha-induced chemotaxis in T cells is mediated by nitric oxide signaling pathways. *J Immunol* 166, 3067-3074.
- Cikala, M., Alexandrova, O., David, C. N., Proschel, M., Stiening, B., Cramer, P., Bottger, A. (2004). The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol* 5, 26.
- Cosulich, S. C., Savory, P. J., Clarke, P. R. (1999). Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol* 9, 147-150.
- Cui, P., Qin, B., Liu, N., Pan, G., Pei, D. (2004). Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp Cell Res* 293, 154-163.

- 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.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., Goodwin, R. G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., Smith, C. A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., Genest, J. (2004). Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 279, 41529-41536.
- Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.
- Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P., Krammer, P. H. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149, 3166-3173.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 15, 2685-2694.
- Eck, M. J., Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-17605.
- Ekert, P. G., Silke, J., Hawkins, C. J., Verhagen, A. M., Vaux, D. L. (2001). DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol* 152, 483-490.
- Erdošova, B., Hlavkova, L., Prochazkova, J., Lichnovsky, V. (2002). Part of CD68+ macrophages in the clearance of apoptotic bodies in human metanephros. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 146, 41-45.
- 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.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* 143, 217-224.
- 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., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- 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.
- Farber, E. (1994). Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 7, 605-609.
- Fink, S. L., Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 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.
- Frey, B. M., Reber, B. F., Vishwanath, B. S., Escher, G., Frey, F. J. (1999). Annexin I modulates cell functions by controlling intracellular calcium release. *Faseb J* 13, 2235-2245.
- Fuentes, L., Perez, R., Nieto, M. L., Balsinde, J., Balboa, M. A. (2003). Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* 278, 44683-44690.
- Gerke, V., Moss, S. E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82, 331-371.
- Gumienny, T. L., Hengartner, M. O. (2001). How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell Death Differ* 8, 564-568.
- 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.
- Hamon, Y., Chambenoit, O., Chimini, G. (2002). ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1585, 64-71.
- 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.
- Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., Okazaki, M., Ueda, K., Yokoyama, S. (2005). Heterogeneity of high density lipoprotein generated by ABCA1 and ABCA7. *J Lipid Res* 46, 1703-1711.
- Hayhoe, R. P., Kamal, A. M., Solito, E., Flower, R. J., Cooper, D., Perretti, M. (2006). Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood* 107, 2123-2130.
- 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. *J Cell Biol* 155, 649-659.
- Horino, K., Nishiura, H., Ohsako, T., Shibuya, Y., Hiraoka, T., Kitamura, N., Yamamoto, T. (1998). A monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer, in phagocytic clearance of apoptotic cells. *Lab Invest* 78, 603-617.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H. (2001). Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104, 781-790.
- Huber, J., Vales, A., Mitulovic, G., Blumer, M., Schmid, R., Witztum, J. L., Binder, B. R., Leitinger, N. (2002). Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 101-107.
- 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.
- Ishii, S., Kihara, Y., Shimizu, T. (2005). Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 280, 9083-9087.
- 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.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
- Jehle, A. W., Gardai, S. J., Li, S., Linsel-Nitschke, P., Morimoto, K., Janssen, W. J., Vandivier, R. W., Wang, N., Greenberg, S., Dale, B. M., *et al.* (2006). ATP-binding cassette transporter A7

- enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol* 174, 547-556.
- Jenkins, C. M., Han, X., Mancuso, D. J., Gross, R. W. (2002). Identification of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) beta, and not iPLA2gamma, as the mediator of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in A-10 smooth muscle cells. Enantioselective mechanism-based discrimination of mammalian iPLA2s. *J Biol Chem* 277, 32807-32814.
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., Gross, R. W. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279, 48968-48975.
- Jenkins, C. M., Wolf, M. J., Mancuso, D. J., Gross, R. W. (2001). Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta. implications for structure and function. *J Biol Chem* 276, 7129-7135.
- Jia, L., Patwari, Y., Srinivasula, S. M., Newland, A. C., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Kelsey, S. M. (2001). Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20, 4817-4826.
- Jones, E. Y., Stuart, D. I., Walker, N. P. (1992). Crystal structure of TNF. *Immunol Ser* 56, 93-127.
- Kabarowski, J. H., Zhu, K., Le, L. Q., Witte, O. N., Xu, Y. (2001). Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* 293, 702-705.
- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Serinkan, B. F., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Liu, S. X., Shvedova, A. A., Fabisiak, J. P., Uthaisang, W., Fadeel, B. (2003). Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization, and recognition of phosphatidylserine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1-17.
- Kagan, V. E., Fabisiak, J. P., Shvedova, A. A., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Schor, N. F., Kawai, K. (2000). Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 477, 1-7.
- 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.
- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, H., Nagata, S. (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443, 998-1002.
- 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.
- Kim, K. S., Ren, J., Jiang, Y., Ebrahim, Q., Tipps, R., Cristina, K., Xiao, Y. J., Qiao, J., Taylor, K. L., Lum, H., *et al.* (2005). GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine. *Faseb J* 19, 819-821.
- Kim, S., Elkon, K. B., Ma, X. (2004). Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21, 643-653.
- Kim, S. J., Gershov, D., Ma, X., Brot, N., 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. *J Exp Med* 196, 655-665.
- Kim, S. W., Rhee, H. J., Ko, J., Kim, Y. J., Kim, H. G., Yang, J. M., Choi, E. C., Na, D. S. (2001). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* 276, 15712-15719.
- Kinchen, J. M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., Hengartner, M. O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature* 434, 93-99.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.

- Kishimoto, T., Soda, Y., Matsuyama, Y., Mizuno, K. (2002). An enzymatic assay for lysophosphatidylcholine concentration in human serum and plasma. *Clin Biochem* 35, 411-416.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsson, P. K., Claesson, H. E., Kennedy, B. P. (1998). Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem* 273, 207-214.
- 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., *et al.* (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 717-730.
- Le, L. Q., Kabarowski, J. H., Weng, Z., Satterthwaite, A. B., Harvill, E. T., Jensen, E. R., Miller, J. F., Witte, O. N. (2001). Mice lacking the orphan G protein-coupled receptor G2A develop a late-onset autoimmune syndrome. *Immunity* 14, 561-571.
- Leist, M., Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liemann, S., Huber, R. (1997). Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 53, 516-521.
- Liemann, S., Lewit-Bentley, A. (1995). Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3, 233-237.
- Linsel-Nitschke, P., Jehle, A. W., Shan, J., Cao, G., Bacic, D., Lan, D., Wang, N., Tall, A. R. (2005). Potential role of ABCA7 in cellular lipid efflux to apoA-I. *J Lipid Res* 46, 86-92.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., Korneluk, R. G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379, 349-353.
- Liu, Q. A., Hengartner, M. O. (1998). Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell* 93, 961-972.
- Ludwig, M. G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R. M., Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425, 93-98.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Ly, J. D., Grubb, D. R., Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8, 115-128.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272, 25417-25420.
- Madeo, F., Frohlich, E., Frohlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., Frohlich, K. U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.
- Maderna, P., Yona, S., Perretti, M., Godson, C. (2005). Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J Immunol* 174, 3727-3733.

- Mancuso, D. J., Jenkins, C. M., Gross, R. W. (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* 275, 9937-9945.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7, 1003-1006.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., Lenardo, M. J. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* 273, 4345-4349.
- Matsura, T., Serinkan, B. F., Jiang, J., Kagan, V. E. (2002). Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* 524, 25-30.
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y., Reed, J. C. (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 318-325.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-2804.
- Mevorach, D., Mascarenhas, J. O., Gershov, D., Elkon, K. B. (1998). Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 188, 2313-2320.
- Miyashita, T., Reed, J. C. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81, 151-157.
- Moodley, Y., Rigby, P., Bundell, C., Bunt, S., Hayashi, H., Misso, N., McAnulty, R., Laurent, G., Scaffidi, A., Thompson, P., Knight, D. (2003). Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162, 771-779.
- Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., Shimizu, T. (2004). G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279, 42484-42491.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.
- Nakano, K., Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- 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.
- Nilsson, C., Johansson, U., Johansson, A. C., Kagedal, K., Ollinger, K. (2006). Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF-alpha induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis* 11, 1149-1159.
- Obinata, H., Hattori, T., Nakane, S., Tatei, K., Izumi, T. (2005). Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A. *J Biol Chem* 280, 40676-40683.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- 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.

- Omer, S., Meredith, D., Morris, J. F., Christian, H. C. (2006). Evidence for the role of adenosine 5'-triphosphate-binding cassette (ABC)-A1 in the externalization of annexin 1 from pituitary folliculostellate cells and ABCA1-transfected cell models. *Endocrinology* 147, 3219-3227.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1259-1263.
- Perez, R., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2006). Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. *J Immunol* 176, 2555-2561.
- Perez, R., Melero, R., Balboa, M. A., Balsinde, J. (2004). Role of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 279, 40385-40391.
- Perretti, M., Ingegnoli, F., Wheller, S. K., Blades, M. C., Solito, E., Pitzalis, C. (2002). Annexin 1 modulates monocyte-endothelial cell interaction in vitro and cell migration in vivo in the human SCID mouse transplantation model. *J Immunol* 169, 2085-2092.
- Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S. (1996). Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12456-12460.
- Qiao, J., Huang, F., Naikawadi, R. P., Kim, K. S., Said, T., Lum, H. (2006). Lysophosphatidylcholine impairs endothelial barrier function through the G protein-coupled receptor GPR4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L91-101.
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G., Steinberg, D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2995-2998.
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Steinberg, D. (1988). Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2805-2809.
- Rabilloud, T., Carpentier, G., Tarroux, P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9, 288-291.
- Radu, C. G., Nijagal, A., McLaughlin, J., Wang, L., Witte, O. N. (2005). Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1632-1637.
- Radu, C. G., Yang, L. V., Riedinger, M., Au, M., Witte, O. N. (2004). T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 245-250.
- Raha, S., Robinson, B. H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 106, 62-70.
- Reddien, P. W., Horvitz, H. R. (2004). The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 193-221.
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366, 127-137.
- Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181, 1857-1862.
- Rescher, U., Danielczyk, A., Markoff, A., Gerke, V. (2002). Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. *J Immunol* 169, 1500-1504.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104, 791-800.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- 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.

- Rosengarth, A., and Luecke, H. (2003). A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol* 326, 1317-1325.
- Rubartelli, A., Poggi, A., Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha(v)\beta3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol* 27, 1893-1900.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., Alnemri, E. S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274, 17941-17945.
- Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Savill, J., Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90, 1513-1522.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 1541-1548.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.
- Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211.
- Shi, Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 8, 394-401.
- Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S., Bolotina, V. M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6, 113-120.
- Smith, J. D., Waelde, C., Horwitz, A., Zheng, P. (2002). Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem* 277, 17797-17803.
- Solito, E., Christian, H. C., Festa, M., Mulla, A., Tierney, T., Flower, R. J., Buckingham, J. C. (2006). Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *Faseb J* 20, 1498-1500.
- Solito, E., Raguene-Nicol, C., de Coupade, C., Bisagni-Faure, A., Russo-Marie, F. (1998). U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. *Br J Pharmacol* 124, 1675-1683.
- Solito, E., Romero, I. A., Marullo, S., Russo-Marie, F., Weksler, B. B. (2000). Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the $\alpha 4 \beta 1$ integrin. *J Immunol* 165, 1573-1581.
- Somersan, S., Bhardwaj, N. (2001). Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol* 155, 501-504.
- Srinivasula, S. M., Datta, P., Fan, X. J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., Alnemri, E. S. (2000). Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275, 36152-36157.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.
- Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J* 14, 6136-6147.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.
- Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.

- Su, H. P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Trampont, A. C., Li, Y., Bu, G., Henson, P. M., Ravichandran, K. S. (2002). Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J Biol Chem* 277, 11772-11779.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M., Ueda, K. (2006). Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem* 281, 10760-10768.
- Takizawa, F., Tsuji, S., Nagasawa, S. (1996). Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* 397, 269-272.
- Tanaka, H., Takeya, R., Sumimoto, H. (2000). A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun* 272, 320-326.
- Tang, J., Kriz, R. W., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., Jones, S. S. (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem* 272, 8567-8575.
- Troeger, A., Schmitz, I., Siepermann, M., Glouchkova, L., Gerdemann, U., Janka-Schaub, G. E., Schulze-Osthoff, K., Dilloo, D. (2007). Upregulation of c-FLIPS+R upon CD40 stimulation is associated with inhibition of CD95-induced apoptosis in primary precursor B-ALL. *Blood*.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.
- Waibel, M., Kramer, S., Lauber, K., Lupescu, A., Manns, J., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Wesselborg, S. (2007). Mitochondria are not required for death receptor-mediated cytosolic acidification during apoptosis. *Apoptosis* 12, 623-630.
- Wakasugi, K., Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 284, 147-151.
- Wang, L., Radu, C. G., Yang, L. V., Bentolila, L. A., Riedinger, M., Witte, O. N. (2005). Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Mol Biol Cell* 16, 2234-2247.
- Wang, N., Lan, D., Gerbod-Giannone, M., Linsel-Nitschke, P., Jehle, A. W., Chen, W., Martinez, L. O., Tall, A. R. (2003). ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) binds apolipoprotein A-I and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux. *J Biol Chem* 278, 42906-42912.
- Wang, N., Tall, A. R. (2003). Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1178-1184.
- Wang, W., Creutz, C. E. (1992). Regulation of the chromaffin granule aggregating activity of annexin I by phosphorylation. *Biochemistry* 31, 9934-9939.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Williamson, P., Schlegel, R. A. (2002). Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1585, 53-63.
- Williamson, P., Schlegel, R. A. (2004). Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor. *J Biol* 3, 14.
- Witte, O. N., Kabarowski, J. H., Xu, Y., Le, L. Q., Zhu, K. (2005). Retraction. *Science* 307, 206.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., Shi, Y. (2000a). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.
- Wu, X., Molinaro, C., Johnson, N., Casiano, C. A. (2001). Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum* 44, 2642-2652.

- Wu, Y. C., Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93, 951-960.
- Wu, Y. L., Jiang, X. R., Lillington, D. M., Newland, A. C., Kelsey, S. M. (2000b). Upregulation of lipocortin 1 inhibits tumour necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol* 111, 807-816.
- Yan, W., Jenkins, C. M., Han, X., Mancuso, D. J., Sims, H. F., Yang, K., Gross, R. W. (2005). The highly selective production of 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine catalyzed by purified calcium-independent phospholipase A2gamma: identification of a novel enzymatic mediator for the generation of a key branch point intermediate in eicosanoid signaling. *J Biol Chem* 280, 26669-26679.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Yang, L. V., Radu, C. G., Wang, L., Riedinger, M., Witte, O. N. (2005). Gi-independent macrophage chemotaxis to lysophosphatidylcholine via the immunoregulatory GPCR G2A. *Blood* 105, 1127-1134.
- Yona, S., Buckingham, J. C., Perretti, M., Flower, R. J. (2004). Stimulus-specific defect in the phagocytic pathways of annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol* 142, 890-898.
- Yona, S., Heinsbroek, S. E., Peiser, L., Gordon, S., Perretti, M., Flower, R. J. (2006). Impaired phagocytic mechanism in annexin 1 null macrophages. *Br J Pharmacol* 148, 469-477.
- Zhou, Z., Hartweg, E., Horvitz, H. R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104, 43-56.
- Zhu, K., Baudhuin, L. M., Hong, G., Williams, F. S., Cristina, K. L., Kabarowski, J. H., Witte, O. N., Xu, Y. (2001). Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 276, 41325-41335.
- Retraction: (2005). Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 280, 43280.
- 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.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

7 Publikationen

Peter, C.*, Waibel, M.*, Radu, C.G., Yang, L.V., Witte, O.N., Wesselborg[#], S., Lauber, K.[#] (2007). Migration to lysophospholipid attraction signals of apoptotic cells is mediated via the phagocyte receptor G2A, zur Veröffentlichung eingereicht

Waibel, M.*, Kramer, S.*, Lauber, K.*, Lupescu, A., Manns, J., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Wesselborg, S. (2007). Mitochondria are not required for death receptor-mediated cytosolic acidification during apoptosis in T cells, *Apoptosis*, 12(3):623-30

Gröbner, S., Schulz, S., Soldanova, I., Gunst, D., Waibel, M., Wesselborg, S., Borgmann, S., Autenrieth, I. (2007). Absence of toll-like receptor 4 signaling results in delayed *Yersinia enterocolitica* YopP-induced cell death of dendritic cells, *Infection and Immunity*, 75(1):512-517

Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses, *Mol Cell*, 14(3):277-87

Buk, D.M., Waibel, M., Braig, C., Martens, A.S., Heinrich, P.C., Graeve, L. (2004). Polarity and lipid raft association of the components of the ciliary neurotrophic factor receptor complex in Madin-Darby canine kidney cells, *Journal of Cell Science*, 117 (Pt10): 2063-75

(* bezeichnet geteilte Erstautorenschaft)

8 Lebenslauf

12. Juni 1978	geboren in Schwäbisch Gmünd (Baden-Württemberg)
1984-1988	Grundschule Bargau
1988-1994	Realschule Heubach
1994-1997	Agnes-von-Hohenstaufen-Schule, Schwäbisch Gmünd Ernährungswissenschaftliches Gymnasium
Juni 1997	Abiturprüfung
Oktober 1997 bis Juli 2003	Studium der Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Stuttgart Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Oktober 2002 bis Juli 2003	Diplomarbeit an der Universität Hohenheim, Stuttgart, am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Fachgebiet Biochemie der Ernährung, unter der Betreuung von Prof. Dr. Lutz Graeve mit dem Titel: <i>„Untersuchungen zur Assoziation von LIF-Rezeptor und IL-6-Rezeptor (gp80) mit lipid rafts“</i>
Oktober 2003 bis Mai 2007	Dissertation im Labor von Prof. Dr. Sebastian Wesselborg an der Universitätsklinik Tübingen, Abteilung für Innere Medizin I, Sektion für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, unter der Betreuung von Prof. Dr. Lutz Graeve (Hohenheim) mit dem Titel: <i>„Eliminierung apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten: Generierung, Freisetzung und Erkennung des monozytären Attraktionssignals Lysophosphatidylcholin und Bedeutung von Annexin I als Brückenprotein in der phagozytotischen Synapse“</i>