

Aus dem Institut für Klinische Chemie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. M. Vogeser

Intra- und extrazelluläre Vesikelbildung nach Zellschädigung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades in Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Pfeiler
aus
Oelsnitz/V.

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Priv. Doz. Dr. Susanna Müller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	5
I.1.	Membranreparatur nach Zellschädigung.....	5
I.1.1.	Mechanismen der Membranreparatur	6
I.2.	Mikropartikel (MP)	13
I.2.1.	Freisetzung der MP	14
I.2.2.	Bedeutung von MP in der Thrombogenese.....	15
I.3.	Zielsetzung der Arbeit.....	17
II.	Material und Methoden.....	18
II.1.	Material	18
II.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
II.1.2.	Chemikalien	19
II.1.3.	Antikörper	20
II.1.4.	Pufferlösungen	21
II.1.5.	Plasmide	21
II.1.6.	Zelllinien	22
II.1.7.	Proteine.....	22
II.2.	Methoden.....	23
II.2.1.	Resealing-Experimente	23
II.2.2.	Konfokal mikroskopische Untersuchungen	25
II.2.3.	Translokation von ER-Vesikeln an Verletzungsstellen <i>in vivo</i>	27
II.2.4.	MP-Experimente	28
II.2.5.	Proteinbestimmung.....	33
II.2.6.	Auswertung und Statistik	33
III.	Ergebnisse	34
III.1.	Resealing-Verhalten von Zellen und die beteiligten Vesikel <i>in vitro</i>	34
III.1.1.	Bedeutung von Ca ⁺⁺ für die Membranreparatur.....	34
III.1.2.	Nachweis von ER-Proteinen an Membranverletzungen <i>in vivo</i>	46
III.2.	MP	47
III.2.1.	Aufnahme von MP in phagozytosekompetente Zellen	47
III.2.2.	Aufnahme von tumorzellgenerierten MP in phagozytosefähige Zellen.....	49
III.2.3.	Untersuchung der an der Aufnahme von MP beteiligten Membranrezeptoren ...	52
III.2.4.	<i>In vivo</i> Analyse der MP-Aufnahme.....	53
III.2.5.	Vergleich der MP-Verteilung in den Organen von wt und CD36 ^{-/-} -Mäusen	53

IV. Diskussion.....	55
IV.1. Membrane Resealing.....	55
IV.1.1. Ursprungskompartimente der an der Zellmembranreparatur beteiligten Vesikel	55
IV.1.2. Exozytose intrazellulärer Vesikel.....	56
IV.1.3. Transportmechanismen der Vesikel in die Plasmamembran	57
IV.1.4. Nachweis von ER-Vesikeln an Verletzungsstellen <i>in vivo</i>	58
IV.2. Freisetzung von MP: potentielle Bedeutung für die Eliminierung von Eat-Me-Signalen.....	60
IV.2.1. Clearance thrombozytärer MP über Phagozytosemechanismen	61
IV.2.2. Clearance karzinomatöser MP durch Fusionsprozesse	61
IV.2.3. MP Clearance als Rezeptorvermittelter Mechanismus	62
IV.2.4. MP Clearance <i>in vivo</i>	62
V. Zusammenfassung	63
VI. Summary	65
VII. Literatur	66
VIII. Danksagung	76

Abkürzungen

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ⁺⁺	Calcium
CCR5	C-C Chemokine Receptor Type 5
CHO	Chinese Hamster Ovary (Zelllinie)
CNX	Calnexin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DCF	5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERES	ER Exit Sites
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
kLSM	konfokale Laserscanmikroskopie
LAMP-1	Lysosome Associated Membrane Protein 1
MAP	Mitogen-Activated Protein
MG53	Mitsugumin53
MP	Mikropartikel
Non-RC	Non Resealing Cell (Irreversibel geschädigte Zellen)
NRK	Normal Rat Kidney (Zelllinie)
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat
PS	Phosphatidylserin
RC	Resealing Cell (Reversibel geschädigte Zellen)
SLO	Steptolysin O
STX	Syntaxin
Syt	Synaptotagmin

TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TI-VAMP	Tetanus Neurotoxin Insensitive-Vesicle Associated Membrane Protein
TF	Tissue Factor
TRIM Protein	Tripartite Motif Family Protein
VSVG	Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

I. Einleitung

I.1. Membranreparatur nach Zellschädigung

Die Fähigkeit einzelliger Organismen, ihre Membranintegrität nach einer Schädigung wiederherzustellen, ist elementar für deren weiteres Überleben.

Der dabei ablaufende Prozess wird als Membrane Resealing oder Membrane Repair, Wiederverschließen der Membran, bezeichnet. Im Vergleich zu Einzellern stellt der Verlust einzelner Zellen innerhalb eines Gewebes nicht zwingend ein Risiko für den gesamten Organismus dar. Ist der Organismus allerdings nicht in der Lage einen stetigen Zellverlust durch Regeneration auszugleichen, kann dies zum Verlust des gesamten Gewebeverbandes führen. Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde an einfachen mehrzelligen Organismen beobachtet, dass es nach Schädigung der Membran zu einer Wiederherstellung der Integrität dieser Membran kam (Wilson 1924).

Dieser Resealing-Prozess ist u.a. von besonderer Bedeutung bei Zellpopulationen, die durch ihre Lokalisation konstitutiv mechanischem Stress ausgesetzt sind. Ein Beispiel hierfür stellen Skelett- (McNeil & Khakee 1992) und Herzmuskelzellen (Clarke *et al.* 1995) dar, welche permanenten Scher- und Zugkräften exponiert sind. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt ergaben sich Hinweise, dass der Erhalt der Membranintegrität dieser Zellen auf einem dem Membrane Resealing zugrunde liegenden Mechanismus basiert.

Am Beispiel der Herzmuskelzellen und Neuronen, welche nicht erneuert werden können, zeigt sich die physiologische Bedeutung der Membranreparaturmechanismen. Wären diese Zellen nicht in der Lage ihre Membranintegrität nach einer Schädigung wiederherzustellen, würde es durch den Verlust der Zellen im Zellverband zur progressiven Entwicklung einer Herzinsuffizienz bzw. neuronalen Degeneration kommen.

Bei Untersuchungen an verschiedenen Zellspezies wurde beobachtet, dass es nach Membranschädigung zu einer Zunahme von intrazellulären Vesikeln und deren Ansammlung im Bereich der Membranverletzungsstelle kommt (Chambers & Chambers 1961, Heilbrunn *et al.* 1958). Damit könnten die Vesikel eine Barriere an der Rupturstelle bilden, die ein Austreten von cytoplasmatischen Komponenten sowie ein weiteres Eindringen extrazellulärer Moleküle verhindern. Entzieht man dem extrazellulärem Medium Calcium (Ca^{++}), ist der Vesikeltransport unterbunden und die Zellen sind nicht in der Lage die Membranintegrität wiederherzustellen (Idone *et al.* 2008). Ca^{++} stellt daher eine elementare Grundbedingung für eine erfolgreiche Membranreparatur dar.

I.1.1. Mechanismen der Membranreparatur

Zur Erklärung des Membrane Resealing wurden verschiedene Mechanismen postuliert, deren Bedeutung im Resealing-Prozess abhängig von der Größe der verletzten Membranareale sein könnte.

I.1.1.1. Spannungsreduktions-Hypothese

Als unmittelbare Folge der Ruptur der Lipiddoppelschicht kommt es zu einer Reorganisation der hydrophoben Anteile der Phospholipide. Dadurch entstehen unterschiedliche Spannkraften, eine lineare Oberflächenspannung und eine gegensätzlich wirkende Membranspannung. Durch die Freilegung der hydrophoben Domänen der Phospholipide an den Rändern der Membranrupturstelle (Chernomordik & Kozlov 2003) kommt es zu einem Anstieg freier Energie. Gleichzeitig entsteht proportional zum Radius der Ruptur eine lineare Spannung. Die anschließende Reorganisation der Lipide führt zur Reduzierung der freien Energie und somit zum erfolgreichen Resealing von Schädigungsarealen einer maximalen Größe von $1\mu\text{m}$ im Durchmesser. Dies wird als vesikelunabhängige Selbstreparatur von Membranen bezeichnet (Abb.1).

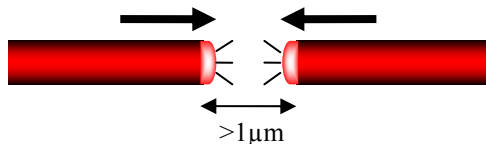


Abb.1 Spontanes vesikelunabhängiges Resealing

(Rupturdurchmesser $<1\mu\text{m}$). Modifiziert nach McNeil & Terasaki 2001.

Kommt es allerdings an den Stellen der Ruptur zum Kontakt zwischen den hydrophilen Phospholipid-Kopfgruppen und dem Cytoskelett entsteht eine messbare Membranspannung. Diese wirkt einer Reorganisation der Lipide an die Rupturstelle entgegen und verhindert ein erfolgreiches Resealing der Membran (Abb.2).

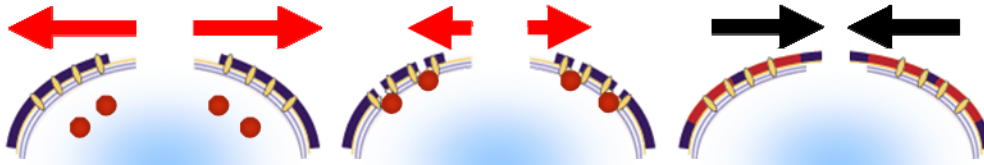


Abb.2 Die Spannungsreduktions-Hypothese

Membranspannung (rote Pfeile) wirkt der linearen Oberflächenspannung (schwarze Pfeile) entgegen. Durch Vesikelfusionen mit der Membran wird die Membranspannung reduziert und eine Membranreparatur ermöglicht. Modifiziert nach McNeil & Terasaki 2001.

Durch den Anstieg von intrazellulärem Ca^{++} nach einer Zellschädigung kommt es zur Aktivierung intrazellulärer proteolytischer Enzyme. Eine daraus resultierende cytoskelettale Antwort auf eine Schädigung verbunden mit einer Vesikelexozytose führt zu einer Reduzierung der Membranspannung und wirkt sich somit positiv auf die erfolgreiche Regeneration der verletzten Membran aus. Eine mögliche Erklärung der so herbeigeführten Spannungsreduktion besteht eventuell darin, dass neue Membranbestandteile ohne einen Kontakt mit dem Cytoskelett einzugehen integriert werden, wodurch die Adhäsionsenergie zwischen Plasmamembran und Cytoskelett reduziert wird.

Am Beispiel von Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration nach einer Zellschädigung zu einer Aktivierung spezifischer Cysteinproteasen (u. a. Calpain-3) in den Zellen führt, die zur Degradation des Cytoskeletts beitragen und damit die Membranspannung reduzieren. Die Größe der Schadensareale hat hierbei einen entscheidenden Einfluss auf ein erfolgreiches Regenerieren der Erythrozyten-Membran. Unter Einwirkung von physiologischen Ca^{++} -Konzentrationen ist eine Reparatur nur möglich, wenn die Ruptur klein genug ist, so dass kein Hämoglobinefflux beobachtet wird (McNeil *et al.* 2003).

In kernhaltigen Zellen tritt die Membranreparatur durch Spannungsreduktion nur bei Rupturarealen mit einem maximalen Durchmesser von $0,2\mu\text{m}$ auf. Im Gegensatz zu den zellkernlosen Erythrozyten sind allerdings Fibroblasten, Muskelzellen und Neurone in der Lage, auch größere Rupturen der Membran erfolgreich zu verschließen. Der entscheidende Unterschied zu den Erythrozyten ist das Vorhandensein von Endomembranen in kernhaltigen Zellen. Die Rekrutierung von intrazellulären Vesikeln an die Verletzungsstelle und eine dadurch entstehende Barriere, befähigt die kernhaltigen Zellen in der Tat größere Membranareale zu reparieren.

I.1.1.2. Patch-Hypothese

Bei verschiedenen Zellspezies, wie Neuronen, Muskel- oder Eizellen, konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Lage sind Rupturen größer als $1\mu\text{m}$ zu verschließen und damit zu überleben (Farkas & Povlishock 2007, Glover & Brown 2007, McNeil & McNeil 2005). Dabei stellt die Verfügbarkeit von intrazellulären Vesikelmembranen für die Wiederherstellung der Membranintegrität eine entscheidende Bedingung dar (McNeil *et al.* 2003, Idone *et al.* 2008).

Nach einer Verletzung kommt es demnach zu einer Zunahme an cytoplasmatischem Ca^{++} und einer dadurch getriggerten Exozytose von intrazellulären Vesikeln. Über Myosin/Kinesin-Transportwege erreichen die Vesikel die Verletzungsstelle und akkumulieren dort. Es kommt zunächst zu einer homotypischen Fusion unter den Vesikeln, danach fusionieren die Vesikel mit den Membranrändern. Proportional zur Größe des verletzten Areals wird an der Verletzungsstelle ein sogenannter „Patch“ aus verschiedenen Membranen gebildet (McNeil & Kirchhausen 2005, Bement *et al.* 2007) (Abb.3). Gleichzeitig verbleiben nicht-fusionierte Vesikel im Cytoplasma, wie u. a. durch die Anwesenheit abnormal großer Vesikel nahe der Verletzungsstelle nachgewiesen wurde (McNeil & Baker 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass es im Bereich der neu regenerierten Plasmamembran zu einer Anlagerung von Membranen cytoplasmatischen Ursprungs kommt (McNeil & Steinhardt 2003).

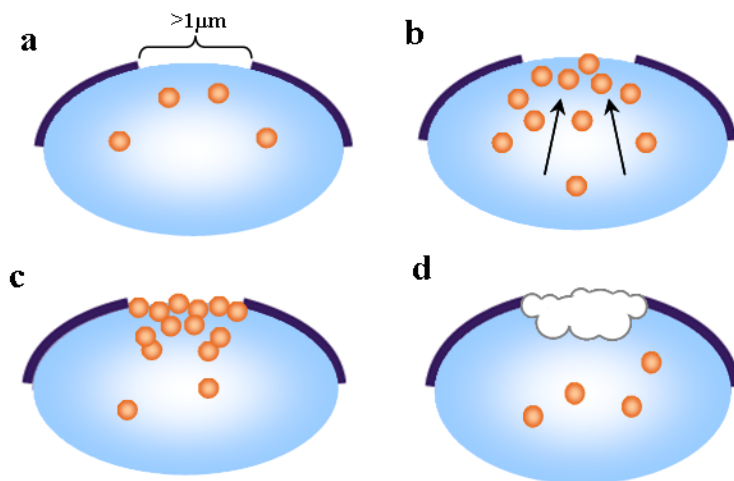


Abb.3 Die Patch-Hypothese

Nach Ruptur der Zellmembran erfolgt ein Ca^{++} -Influx in die Zelle (a), dieser triggert eine schnelle Vesikelexozytose über Myosin/Kinesin-Transportwege (b). Unter den Vesikeln kommt es zu homotypischen Fusionen, danach zur Fusion mit den Membranrändern (c). Es bildet sich ein Patch aus fusionierten Vesikeln über die gesamte Fläche der Membranruptur (d). Modifiziert nach McNeil & Kirchhausen 2005.

I.1.1.2.1. Ursprung der exozytierten Vesikel

Da die Zunahme des cytoplasmatischen Ca^{++} essentiell für die Resealing-Fähigkeit von kernhaltigen Zellen ist, ist davon auszugehen, dass nur Organellen an der Vesikelbereitstellung beteiligt sind, welche eine Sensitivität gegenüber Ca^{++} besitzen. Im Folgenden wird die Bedeutung einzelner an der Membranreparatur beteiligter Organellen detaillierter beschrieben.

Kortikale Granula

In der Membran von unbefruchteten Seeigeleiern konnte die Ansammlung von über 10.000 Kortikalen Granula unterhalb der Zellmembran gezeigt werden. Durch eine Membranschädigung und den darauffolgenden Anstieg von cytosolischem Ca^{++} , kam es zur Exozytose der Granula (Bi *et al.* 1995, Steinhardt *et al.* 1994). Dabei wurde auch eine Fusion der Kortikalen Granula mit der Zellmembran nachgewiesen, die quantitativ mit der Resealing-Antwort der Eizellen korrelierte (Bi *et al.* 1995).

Dotter Granula

Im Gegensatz zu unbefruchteten Oozyten stehen befruchteten Seeigeleiern nur wenige Kortikale Granula zur Reparatur einer Membranverletzung zur Verfügung. Es wurde beobachtet, dass in diesem Falle die zur Reparatur benötigten Vesikel von Dotter Granula stammen. Außerdem ist auch ein möglicherweise stärkerer Ca^{++} -Anstieg für eine erfolgreiche Membranreparatur in befruchteten Seeigeleiern notwendig. Die Exozytose dieser Vesikel kann durch proteolytisch-wirkende Neurotoxine gehemmt werden (Bi *et al.* 1997, Steinhardt *et al.* 1994), des Weiteren handelt es sich um einen aktiven Myosin/Kinesin-abhängigen Transport der Dotter Granula an die Membranschädigungsstellen.

Die Bedeutung der Dotter versus Kortikalen Granula beim Resealing-Prozess in Eizellen richtet sich nach der Größe der Schädigungen. Kortikale Granula ermöglichen prinzipiell die Reparatur kleinerer Membranschäden während Dotter Granula zur Reparatur größerer Membranschäden in der Lage sind (McNeil & Kirchhausen 2005).

Schon in den 60iger Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Dotter Granula lysosomale Eigenschaften besitzen (Pasteels *et al.* 1966). In der Tat konnten Phosphatase Aktivitäten in den Dotter Granula nachgewiesen werden, zudem findet der endozytotische Transport der Granula-Proteine in Kompartimenten statt, welche lysosomale Enzyme beinhalten (Busson-Mabillot 1984).

Lysosomen

Lysosomen stellen den Endpunkt von endozytotischen Transportwegen dar. Sie werden prinzipiell nicht direkt an die Plasmamembran zurücktransportiert. Da frühe Endosomen im Gegensatz dazu an die Plasmamembran rezyklieren, vermutete man eine mögliche Beteiligung dieser Vesikel bei der Membranreparatur. Allerdings konnte kein Ca^{++} -abhängiger Vesikeltransport für Endosomen nachgewiesen werden.

Jedoch wurde anhand von Untersuchungen des Infektionsweges des einzelligen Parasiten *Trypanosoma cruzi* die Beteiligung lysosomaler Vesikel an der Membranreparatur bestätigt. Der Erreger induziert einen Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration in der Wirtszelle, gefolgt von einer Fusion der Lysosomen mit der Plasmamembran. Zu einem frühen Zeitpunkt der Assoziation der trypomastigoten Form des Erregers mit der betroffenen Zelle wurde ein Anstieg lysosomaler Vesikel im Bereich der Plasmamembran beobachtet (Tardieux *et al.* 1992). Die Invasion des Erregers findet über die Endozytose in Vakuolen statt und es konnten Membranbestandteile lysosomalen Ursprungs in der Vakuole nachgewiesen werden (Andrews *et al.* 2002). *T. cruzi* nutzt diesen Lysosomen-vermittelten Mechanismus um auf verschiedene Zellpopulationen übergreifen zu können. Wie bei der Membranreparatur, basiert also auch die Invasion der Parasiten auf einem Anstieg des intrazellulären Ca^{++} -Niveaus, der die Exozytose lysosomaler Vesikel induziert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden verschiedene Zellpopulationen auf die Freisetzung spezifischer Markerproteine für intrazelluläre Organellen an der Schädigungsstelle der Membran untersucht. Dabei zeigte sich wiederholt eine Expositionierung lysosomaler Proteine (Andrews *et al.* 2002, Rodriguez *et al.* 1997, 1999).

In diesen Studien wurde die TIRF-Mikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence) eingesetzt, die die Beobachtung von Prozessen nahe der Zellmembran bei hoher Zeitauflösung ermöglicht, und damit eine adäquate Methode zur Visualisierung von Exozytoseprozessen darstellt. So wurden bei CHO (Chinese Hamster Ovary) und NRK (Normal Rat Kidney) Zellen die Akkumulierung spezifischer Markerproteine für verschiedene Zellorganellen, wie ER, sowie frühe und späte Endosomale Vesikel in der Nähe der Plasmamembran beobachtet (Schmoranzner *et al.* 2000). Dabei kam es ausschließlich zur Exozytose lysosomaler Vesikel. Allerdings zeigten die Beobachtungen eine langsamere Exozytosegeschwindigkeit der Lysosomen verglichen mit der benötigten Zeit für einen erfolgreichen Resealing-Prozess (Jaiswal *et al.* 2002).

Unter denselben Bedingungen konnte ebenfalls ein Zusammenhang der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration mit der Exozytosegeschwindigkeit nachgewiesen werden. Ein in lysosomalen Membranen nachweisbares Ca^{++} -abhängiges Transmembranprotein ist Synaptotagmin (Syt). Es besitzt zwei Ca^{++} -Bindungsstellen und funktioniert somit möglicherweise als Sensor für die Ca^{++} -getriggerte Exozytose (Tucker & Chapman 2002, Martinez *et al.* 2000). Auch der Nachweis der weitverbreiteten Isoform SytVII an der Oberfläche regenerierter Zellen durch spezifische Marker (Reddy *et al.* 2001) und die Hemmung der Exozytose durch Blockade der C_2A -Domäne von SytVII, zeigt dessen Einfluss auf die Exozytose von Lysosomen und die damit verbundene Membranreparatur. Innerhalb dieses SytVII-regulierten Exozytoseweges konnte ebenfalls eine Beteiligung spezifischer Fusionsproteine (SNAREs, Kap. I.1.1.2.2) nachgewiesen werden (Rao *et al.* 2004).

Analysen an 3T3 Fibroblasten, CHO- und NRK-Zellen nach einer mechanischer Ruptur der Zellmembran zeigten eine Ca^{++} -abhängige Exposition der luminalen Domäne des Lysosomen-spezifischen Markerproteins LAMP-1. Blockiert man die cytoplasmatischen Domänen verschiedener lysosomaler Proteine, wie LAMP-1 und SytVII, und unterbindet somit eine Fusion mit der Zellmembran, führte dies zu einer deutlichen Einschränkung des Membran Resealing (Reddy *et al.* 2001). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Ca^{++} -abhängige Exozytose lysosomaler Vesikel eine zentrale Rolle in der Membranreparatur spielt.

Enlargeosomen

Neben Lysosomen könnten auch cytoplasmatische Vesikel, die Enlargeosomen, an dem Wiederverschließen der Zellmembran beteiligt sein. Diese Zellkomponente kann anhand eines spezifische Markerproteins Desmoyokin/AHNAK detektiert werden (Borgonovo *et al.* 2002). In der Tat wurde eine Ca^{++} -abhängige Exozytose von Enlargeosomen nachgewiesen (Cocucci *et al.* 2004). Im Gegensatz zu lysosomalen Vesikeln ist die Fusion von Enlargeosomen mit der Zellmembran nicht durch Tetanus Toxin inhibierbar (Borgonovo *et al.* 2002). Dies weist auf die Beteiligung verschiedener Fusionsproteine bei der Exozytose der unterschiedlichen organellenspezifischen Vesikel hin (Kap. I.1.1.2.2).

Bei der Membranreparatur in Muskelzellen spielt das Ca^{++} -regulierte Fusionsprotein Dysferlin eine entscheidende Rolle (Bansal *et al.* 2003). Interessanterweise konnte eine Interaktion von Dysferlin mit dem für Enlargeosomen spezifischen Markerprotein Desmoyokin/AHNAK nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung

nahe, dass Enlargeosomen an der schnellen Resealing-Antwort der Muskelzellen auf mechanischen Stress beteiligt sind (Huang *et al.* 2007).

I.1.1.2.2. Molekulare Mechanismen der Vesikelexozytose

Fusionen intrazellulärer Vesikel beziehungsweise von Vesikeln mit Zellmembranen werden durch SNAREs (*soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor*) vermittelt. Diese Fusionsproteine sind somit sowohl an sekretorischen wie auch an endozytotischen Prozessen (Pelham 2001) beteiligt.

Man unterscheidet zwei verschiedene Populationen von SNARE Proteinen. Als v-SNARE (v, vesicle) bezeichnet man Fusionsproteine, welche sich auf der Oberfläche der intrazellulären Vesikel befinden. Ihnen stehen t-SNAREs (t, target) gegenüber, welche den Kontakt der Vesikel mit der Zellmembran ermöglichen. Aufgrund der Tatsache, dass beide Populationen gleichzeitig auf einer Membran nachgewiesen werden konnten, klassifiziert man heutzutage SNAREs anhand ihrer konservierten Arginin (R)- und Glutamin (Q)-Reste, und unterscheidet zwischen R-SNAREs und Q-SNAREs (Fasshauer *et al.* 1998).

Eine durch SNAREs vermittelte Fusion von Membranen läuft in verschiedenen Phasen ab. Der oben beschriebene Ca^{++} -Influx in die Zelle während einer Schädigung versetzt die SNARE Proteine in einen aktiven Zustand und fördert eine Aneinanderlagerung von Membranen. Der so entstandene relativ stabile trans-Komplex verringert die Distanz zwischen der Vesikel- und der Zellmembran. Durch die direkte Verankerung der v- und t-SNAREs bildet sich ein cis-Komplex aus, der eine Fusion der unterschiedlichen Membranen ermöglicht (Sudhof 2004).

Bei verschiedenen Zelltypen zeigte sich unter der Einwirkung von Tetanus oder Botulinum Toxinen ein verändertes Resealing-Verhalten. Das lässt sich durch das Vorhandensein spezifischer Bindestellen für diese Toxine auf den SNARE Proteinen erklären (Bi *et al.* 1995). Schädigt man die Membran von Fibroblasten unter der Einwirkung von Tetanus oder Botulinum Toxinen wird das Resealing um bis zu 80% reduziert, wohingegen 20% der Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung zeigten und somit deren Resealing-Fähigkeit nicht eingeschränkt war (Togo *et al.* 1999, Steinhardt *et al.* 1994). Dies lässt vermuten, dass in diesem Fall Tetanus Toxin resistente v-SNAREs, sogenannte TI-VAMP oder VAMP7 (Tetanus neurotoxin insensitive-vesicle associated membrane protein) an der Reparatur der geschädigten Membranabschnitte beteiligt sind (Chaineau *et al.* 2009, Borgonovo *et al.* 2002).

I.2. Mikropartikel (MP)

Die oben beschriebene Exozytose von Vesikeln als Reaktion auf eine Membranverletzung führt zu einem Zugewinn an Zelloberfläche (Ninomiya *et al.* 1996). Wenn ein Zellverband aufgrund seiner Lokalisation kontinuierlich seine Membran reparieren muss (zum Beispiel als Folge der shear stress-Exposition), könnte dies zu einer schwer kontrollierbaren Zunahme des Zellvolumens führen.

Um dies zu verhindern, besitzen Zellen die Möglichkeit „überschüssige“ Membrananteile freizusetzen. MP wurden erstmals im Überstand von Thrombozyten nachgewiesen (Wolf 1967). Sie sind unter anderem definiert durch ihren Durchmesser, der zwischen 100 - 800nm liegt. Ein charakteristisches Merkmal stellt das Vorhandensein von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche dar. Die im humanen Blut konstitutiv unter physiologischen Bedingungen zirkulierenden MP stammen von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten, sie werden aber ebenso von Zellen der Gefäßwand, wie Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen gebildet. Die Mehrheit der unter physiologischen Bedingungen zirkulierenden MP werden von Thrombozyten sezerniert (George *et al.* 1982).

MP tragen die typische Protein- und Lipidausstattung ihrer Ursprungszelle, von deren Zellmembran sie freigesetzt wurden (Abid Hussein *et al.* 2003, Joop *et al.* 2001, Berckmans *et al.* 2001). Eine gesteigerte Freisetzung von MP erfolgt nach Zellaktivierung (z.B. durch Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombin und Kollagen), durch Apoptose, Zellalterung („cell maturation“) (van Wijk *et al.* 2003), sowie oxidativen (Vince *et al.* 2009) und mechanischem Stress („shear stress“) (Reininger *et al.* 2006).

Die Protein- und Lipidzusammensetzung der Membranproteine ist auch vom Entstehungsprozess der MP abhängig (Diamant *et al.* 2004, Heijnen *et al.* 1999). Beispielsweise konnte P-Selectin, welches nach Aktivierung von Thrombozyten auf die Zelloberfläche transloziert wird, auch auf den daraus generierten MP detektiert werden. Bei verschiedenen kardiovaskulären und malignen Erkrankungen wurde eine Erhöhung des MP-Spiegels im Blut nachgewiesen, wie beispielsweise nach Myokardinfarkt (Mallat *et al.* 2000), bei arterieller Hypertonie (Preston *et al.* 2003), Diabetes mellitus (Feng *et al.* 2010), sowie bei Magen- und Bronchialkarzinomen (Kim *et al.* 2003, Kanazawa *et al.* 2003).

I.2.1. Freisetzung der MP

Unter physiologischen Bedingungen können prokaryotische und eukaryotische Zellen kleine Membranvesikel spontan sezernieren (Beaudoin & Grondin 1991). Diese Freisetzung erfolgt unabhängig von Apoptose oder Zelltod und stellt eine normale zelluläre Funktion der Zelle dar. Man geht davon aus, dass die lipidreichen Mikrodomänen (Rafts) der Zellmembran als Ursprungsort für die MP-Freisetzung von Bedeutung sind (Del Conde *et al.* 2005, Hugel *et al.* 2005). Rafts bestehen vornehmlich aus Cholesterol und Sphingolipiden. Eine Reduktion des Membrancholesterols und damit die Desintegration der Rafts durch Methyl- β -Cyclodextran bewirkt eine Verminderung der MP-Freisetzung.

I.2.1.1. Bedeutung von Ca^{++} für die MP-Freisetzung

Bei verschiedenen Prozessen, die mit einer Steigerung der MP-Freisetzung einhergehen, kommt es zum Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{++} -Konzentration, so z.B. bei Apoptose oder mechanischem Stress. Dieser Ca^{++} -Anstieg induziert Veränderungen der Phospholipid-Verteilung in der Zellmembran. Unter Ruhebedingungen sind in der äußeren Membranschicht die ungeladenen Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin lokalisiert, während sich die negativ geladenen Phospholipide in der inneren Membranschicht befinden (Phosphatidylserin, PS; Phosphatidylinositol). Die Aufrechterhaltung dieser asymmetrischen Verteilung wird durch verschiedene Enzyme aktiv reguliert (Sims & Wiedmer 2001). Das Enzym Flippase fördert durch seine Spezifität für PS und Phosphatidylethanolamin deren Lokalisierung in der inneren Membranschicht. Im Gegensatz dazu fördert die Floppase den Transport der Phospholipide in das äußere Blatt der Zellmembran. Ein weiteres Enzym, die Lipid-Scramblase, ist für die unspezifische bidirektionale Umverteilung der Phospholipide in der Plasmamembran zuständig (Bever *et al.* 1999).

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration führt zu einer Aktivitätssteigerung der Scramblase und Floppase, sowie zu einer Hemmung der Flippase-Aktivität. Dieser Prozess findet während der Zellaktivierung und ebenso während der Apoptose statt. Die Veränderungen in den Enzymaktivitäten bewirken letztlich eine Translokation von PS an die Außenseite der Zellmembran (Zwaal & Schroit 1997). Damit wird die Phospholipid-Asymmetrie der Plasmamembran aufgehoben. Zellen, die PS externalisieren, werden von phagozytosefähigen Zellen erkannt und internalisiert (Wu *et al.* 2006).

Bei den unter I.1 erwähnten Resealing-Prozessen kommt es zu einem Ca^{++} -Influx in die Zelle. Dies ist möglicherweise mit einer PS-Externalisierung verbunden. Resealing-Zellen sind

durch die erfolgreiche Wiederherstellung der Membranintegrität in der Lage ihre Apoptose abzuwenden. Möglicherweise spielt dabei eine Sezernierung PS-haltiger MP eine wichtige Rolle, die verhindert, dass Resealing-Zellen durch Makrophagen phagozytiert werden.

I.2.2. Bedeutung von MP in der Thrombogenese

Die oben erwähnte Expositionierung von PS spielt in der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle, da PS eine prokoagulatorische Oberfläche für Enzymkomplexe der Blutgerinnung bereitstellt (Zwaal & Schroit 1997). Es wurde an verschiedenen Zellen nachgewiesen, dass freigesetzte MP das transmembranöse Koagulationsstarterprotein Tissue Faktor (TF) auf ihrer Oberfläche tragen können (Müller *et al.* 2003, Shet *et al.* 2003, Leroyer *et al.* 2007, Hron *et al.* 2007). Die Bildung eines TF-FVIIa-Komplexes stellt zusammen mit der PS-Externalisierung einen initialen Schritt in der Thrombinbildung und damit Blutgerinnung dar. Es konnte nachgewiesen werden, dass TF in Rafts lokalisiert ist (Mandal *et al.* 2006), welche als Ursprungsort der MP Sezernierung gelten. Durch den Nachweis, dass verschiedene Zellpopulationen TF-haltige MP generieren, rückten die MP in den Mittelpunkt von Untersuchungen zur Thrombogenese bei Patienten mit Krebserkrankungen (Tesselaar & Osanto 2007, Furie & Furie 2006) sowie in der Transfusionsmedizin (Simak & Gelderman 2006). Man geht davon aus, dass die beobachtete verstärkte Thromboseneigung bei Patienten nach einer Bluttransfusion auf die darin enthaltenen TF-haltigen MP zurückzuführen ist (Vincent *et al.* 2002).

I.2.2.1. Übertragung von Oberflächenrezeptoren durch MP

Eine neu entdeckte Eigenschaft von Mikropartikeln ist deren Fähigkeit Rezeptoren der Donorzellen auf Akzeptorzellen zu übertragen (Janowska-Wieczorek *et al.* 2006). Dies stellt eine Art von Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen dar. MP sind dadurch direkt in der Lage, intrazelluläre Prozesse der Akzeptorzellen zu beeinflussen (Al-Nedawi *et al.* 2008). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Übertragung von Cytokin- und Chemokinrezeptoren auf hämatopoetische Zellen und Tumorzellen deren Zellaktivität, Proliferation und Chemotaxis reguliert werden kann. Die Bedeutung der Rezeptorübertragung könnte ebenfalls eine Rolle in der Virusinfektion von Zellen spielen. So sensibilisiert die Übertragung von CCR5 Rezeptoren durch MP auf CCR5-negative Zellen letztere für ein Eindringen des HI-Virus (Mack *et al.* 2000).

I.2.2.2. Bedeutung der MP in der Tumorgenese

Von zunehmender Bedeutung sind MP in der Tumorgenese, unter anderem aufgrund der erwähnten Rezeptorübertragung. Damit könnten in den Akzeptorzellen auch intrazelluläre Signalwege angestoßen werden, welche die onkogene Transformation von Nicht-Tumorzellen fördern könnten.

Aus Tumorzellen freigesetzte MP können in der Tat mutagene Rezeptoren und tumorgene Eigenschaften der Ursprungszelle auf gesunde Zellen übertragen und damit zur Transformation der Akzeptorzellen beitragen. *In vitro* Untersuchungen an Glioma-Tumorzellen zeigen, dass die tumorzellgenerierten MP in der Lage sind, die onkogene Form des EGF Rezeptors (EGFRviii) auf andere Zellen zu übertragen (Al-Nedawi *et al.* 2008). Durch die damit verbundene Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege, wie den MAP-Kinase-Weg, konnte eine onkogene Transformation der Zellen beobachtet werden. In diesem Falle werden die Rezeptor-übertragenden MP Onkosome genannt. Durch die MP-Freisetzung ist andererseits die Tumorzelle auch in der Lage tumorspezifische Antigene von der Membranoberfläche zu entfernen, was beispielsweise eine Detektion durch Immunzellen verhindert (Andreola *et al.* 2002).

Die prothrombogene Wirkung der MP, ihre Beteiligung an der Leukozytenadhäsion, an proinflammatorischen Prozessen und bei der Transformation von gesunden in karzinomatöse Zellen zeigt die immense (patho)physiologische Bedeutung der MP.

I.3. Zielsetzung der Arbeit

Zellen können nach Verletzungen die Integrität ihrer Plasmamembran schnell wiederherstellen, indem Vesikel an die Verletzungsstelle rekrutiert werden, die die Membranruptur verschließen helfen. An diesem Resealing-Prozess sind verschiedene Zellkomponenten beteiligt. Ein bislang wenig berücksichtigter Aspekt hierbei ist eine potentielle Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Da das ER die prozentual größte Membranoberfläche innerhalb der Zelle besitzt, ist es denkbar, dass das ER Vesikel für die Membranreparaturen zur Verfügung stellt.

In dieser Arbeit wurde daher folgenden Fragen nachgegangen:

- Sind ER-generierte Vesikel an der schnellen Reparatur von Verletzungen der Zellmembran beteiligt?
- Fusionieren ER-Vesikel an der Schädigungsstelle der Membran und ist somit eine Exposition von luminalen ER-Proteinen auf der Zelloberfläche nachweisbar?
- Über welche Mechanismen könnten ER-Vesikel schnell an die Zellmembran transloziert werden?

Nach Zellverletzungen kommt es unter anderem zur Freisetzung von MP aus der Zellmembran. Bislang ist jedoch unbekannt wie die extrazelluläre MP-Konzentration reguliert wird und insbesondere über welche Mechanismen die Clearance der MP vermittelt wird. Daher befasst sich der zweite Teil der Arbeit mit der Klärung der Internalisierung von MP in phagozytosekompetente Zellen.

- Welche Mechanismen vermitteln die Clearance der MP aus gesunden Zellen?
- Werden auch MP aus karzinomatösen Zellen in Zielzellen internalisiert?
- Welche Rezeptoren der Akzeptorzellen sind an der Clearance der MP beteiligt?

II. *Material und Methoden*

II.1. **Material**

II.1.1. **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Alle nicht separat aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Bakterienschüttler Certomat R HK	Braun (Melsungen, D)
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Epics XL (Krefeld, D)
ELISA Reader Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
LSM 510 Meta	Zeiss (Jena, D)
Lichtmikroskop Axiovert100	Zeiss (Jena, D)
Mini-MACS-Trennsäulen	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
Microcon YM-30	Millipore/Merk (Darmstadt, D)
pH-Meter	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
Photometer	Spectra Rainbow TECAN (Crailsheim, D)
Schüttler Typ KS 250 basic	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Spritzenfilter 0.2µm	Roth (Karlsruhe, D)
Tetraspeck microspheres 0.1µm	Molecular Probes (Eugene, USA)
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disrupter B-15	Heinemann (Schwäbisch Gmünd, D)
Vortex Genie-2	Scientific Industries (Bohemia/NY, USA)
µ-Dish ^{35mm, low} , ibiTreat	Ibidi Integrated BioDiagnostics (München, D)
Zeba TM Desalt Spin Columns	Pierce (Rockford, IL, USA)
Zentrifugen: Rotina 35R/Universal 32, Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, D)

II.1.2. Chemikalien

Alexa Fluor® Succinimidyl Ester	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth (Karlsruhe, D)
DCF	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
((5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (5(6)-CFDA, SE; CFSE) - mixed isomers))	
Dc Protein Assay Reagenz A und B	BioRad (München, D)
Dextran Conjugates	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
D-MEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Femtotips II	Eppendorf (Hamburg, D)
Ficoll-Paque Plus (Dichte 1.077g/ml)	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
FM® Lipophilic Styryl Dyes	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
FM® 4-64; FM®4-64FX	
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
Glass Beads, acid-washed	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Iloprost	Bayer Schering Pharma AG (Berlin, D)
Kollagen Typ I	Nycomed Pharma GmbH (Konstanz, D)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Vybrant DiD	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
MEM- α -Medium	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Opti®MEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT)

PMA (Phorbol 12-myristate 13-Acetat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Streptolysin O aus Streptococcus pyogenes	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Syto® Red Fluorescent Nucleic Acid Stains	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT)
TurboFect™	Fermentas International Inc. (Burlington, CAN)

II.1.3. Antikörper

anti-Calnexin ER membrane marker antibody, C-terminal, rabbit polyclonal antibody	Abcam, (Cambridge, UK)
anti-Calnexin ER membrane marker antibody, N-terminal, rabbit polyclonal antibody	Abcam, (Cambridge, UK)
anti-Calnexin, rabbit polyclonal antibody, C-terminal	Stressgen/Biomol (Ann Arbor, USA)
anti-Calnexin, rabbit polyclonal antibody, N-terminal	Stressgen/Biomol (Ann Arbor, USA)
Anti-CD14-microbead-Antikörper	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
anti-CD36 [JC63.1], mouse monoclonal antibody	Abcam, (Cambridge, UK)
anti-mouse CD36 [JC63.1], mouse monoclonal antibody	BD Pharmingen™ (Erembodegem, BE)
anti-desmoyokin-AHNAK, rabbit polyclonal antibody	Jacopo Meldolesi, Department of Neuroscience, Vita-Salute San Raffaele University and Excellence Centre in Cell Differentiation (Milan, I)
anti-ERp57 [MaP.ERp57], mouse monoclonal antibody	Peter Cresswell, Department of Immunobiology, Yale University (New Haven, USA)
58K Golgi protein antibody [58K-9], mouse monoclonal antibody, Golgi Marker	Abcam (Cambridge, UK)
anti-GRP94 [9G10], rat monoclonal antibody	Stressgen/Biomol (Ann Arbor, USA)
goat IgG, Isotyp-Kontrolle	Zymed®Laboratories (San Francisco, USA)
mouse IgA, κ, Isotyp-Kontrolle	BD Pharmingen™ (Erembodegem, BE)
mouse IgG, Isotyp-Kontrolle	Zymed®Laboratories (San Francisco, USA)

mouse IgG1, Isotyp-Kontrolle	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
anti-mouse IgG _{2a} [UPC-10]	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
anti-rat IgG _{2a} [R2A-2]	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
rabbit IgG, Isotyp Kontrolle	Zymed®Laboratories (San Francisco, USA)
anti-LAMP1 [LY1C6], rabbit polyclonal antibody, Lysosome Marker	Abcam (Cambridge, UK)
Mannosidase II antibody [53FC3], mouse monoclonal antibody, Golgi Marker	Abcam (Cambridge, UK)
anti-PDI [RL90], mouse monoclonal antibody	Affinity BioReagents (Golden, CO, USA)
anti-PDI [H-10], rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, USA)
anti-Syntaxin18, mouse monoclonal antibody	Dr. Mitsuo Tagaya, Tokyo University of Pharmacy&Life Science (Tokyo, JP)

II.1.4. Pufferlösungen

Antikörperpuffer	5mM EDTA, 0.5% BSA, in PBS pH 7.4
FACS-Puffer	136mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl ₂ , 2.5mM CaCl ₂ , 10mM Hepes, in a.bidest, pH 7.4
Monozytenwaschpuffer	1mM EDTA, 0.15% BSA, in PBS, pH 7.4
PBS (Phosphat- buffered saline)	137mM NaCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ , in a.bidest, pH 7.4
Resuspensionspuffer	138mM NaCl, 12mM NaHCO ₃ , 5mM Glucose, 5mM Hepes, 2.7mM KCl, 1mM MgCl ₂ x6H ₂ O, 0.4mM NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O, in a.bidest, pH 7.35
Thrombozytenwaschpuffer	138mM NaCl, 2.7mM KCl, 1mM MgCl ₂ , 15mM Hepes, 2.1mM EDTA, 5mM Glucose, 14mM Tri-Natriumcitrat, in a.bidest, pH 6.3

II.1.5. Plasmide

pLAMP1-mGFP [pEGFP-N3]	Esteban C. Dell'Angelica, Department of Human Genetics, UCLA (Los Angeles, USA)
------------------------	---

PR-CD5L-HA-erRFP [pEAK]	Felipe X. Pimentel-Muiños, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC (Salamanca, ESP)
CFP-CNX [pEYFP vector]	Vladimir M. Korkhov, Institute of Molecular Biology and Biophysics (Zurich, CH)
Hs_SEC22L1_3 HP siRNA (NM_004892)	Qiagen (Hilden, D)
AllStars Negative siRNA AF 488	Qiagen (Hilden, D)
pcDNA3-Sar1(H79G) [pDNA3.1(-)]	Robert D. Burgoyne, The Physiological Laboratory, University of Liverpool (Liverpool, UK)
CFP-galT1 [pECFP-Golgi]	Michael Lorenz, DHZ (München, D)
AHNAK-N (N949), [pEGFP-N1]	Emma Shtivelman, Bionovo, Inc., Emeryville, USA)
TF-CFP [pcDNA3mycHis]	Katja Wäldele, Klinische Chemie, LMU (München, D)
pOct-YFP [pcDNA3]	Kai Hell, Physiologische Chemie, LMU (München, D)

II.1.6. Zelllinien

CHO (Chinese Hamster Ovarian, CCL-61)	CCL-61, American Type Culture Collection
FG	Christiane Bruns, Experimentelle Chirurgie, LMU (München, D)
Humane Fibroblasten	Heidemarie Neitzel, Institut für Humangenetik CVK, Charité-Universitätsmedizin (Berlin, D)
L3.6pl	Christiane Bruns, Experimentelle Chirurgie, LMU (München, D)
THP1	DSMZ ACC 16, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, D)

II.1.7. Proteine

Sar1p	Sebastian Springer, Springer Laboratory, Zellbiologie, Biochemie und Molekulare Immunologie, Jacobs Universität (Bremen, D)
Sar1[T39N]p	

II.2. Methoden

II.2.1. Resealing-Experimente

Hierbei wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht ihre Membran nach einer Schädigung wieder zu regenerieren. Um die Wiederverschließung der Zellmembran nach einer Schädigung nachzuweisen, wurden zwei verschiedene fluoreszierende Dextrane verwendet. Hintergrund hierbei ist, dass das erste Dextran bei einer mechanischen oder chemischen Schädigung in die Zelle diffundieren kann. Nach einem definierten Resealing-Zeitraum wird von wiederverschlossenen Zellen (Resealing Cells, RC) ein zweites zugegebenes Dextran exkludiert, während nicht wiederverschlossene Zellen auch das zweite Dextran aufnehmen (Non-Resealing Cells, Non-RC).

Die Verletzung der Zellen erfolgte mechanisch durch Glaskügelchen (Sigma) oder chemisch durch Mikroperforation mit Streptolysin O (Sigma). Anschließend wurden die Zellen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert.

II.2.1.1. Zellkultur

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die durchgeführten Resealing-Experimente CHO-Zellen (CCL-61, American Type Culture Collection) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie aus Chinesischen Hamster Ovarien, die sich besonders zur Durchführung von Transfektionsexperimenten eignet.

Zu Beginn der Experimente wurde das Kulturmedium (MEM- α -Medium, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) entfernt und die adhärennten CHO-Zellen mittels einer PBS/EDTA - Lösung von den Zellkulturflaschen gelöst und zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Viabilität der Zellen wurden mittels einer Trypanblaufärbung unter einem Lichtmikroskop überprüft. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer improved Zählkammer verwendet. Für die am darauffolgenden Tag durchzuführenden Experimente wurden grundsätzlich 2.5×10^5 Zellen auf speziellen, für inverse Mikroskope geeignete Zellkulturplatten (μ Dish, Ibidi) ausgesät und über Nacht in MEM- α -Medium bei 37°C in einer 5%CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert.

II.2.1.2. Ca^{++} -Abhängigkeit des Resealing-Verhaltens

Um die Ca^{++} -Abhängigkeit des Resealing-Verhaltens der Zellen nachzuweisen, wurde der verwendeten PBS-Lösung entweder zusätzliches Ca^{++} (1mM) zugeführt oder durch die Zugabe des Komplexbildners EGTA (5mM) das gesamte Ca^{++} gebunden und somit entzogen. Nachdem in Kapitel III.1.1. die Ca^{++} -Abhängigkeit des Resealing-Prozesses gezeigt werden konnte, wurden die weiteren Experimente (sofern nicht anders erwähnt) immer unter Verwendung einer 1mM- Ca^{++} /PBS-Lösung durchgeführt.

II.2.1.3. Glaskügelchen-Schädigung der Zellmembran

CHO-Zellen (2.5×10^5 pro Zellkulturschale) wurden am Vortag auf μ Dishes (Zellkulturschale, Tissue culture treated, steril, \varnothing 35mm) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert.

Danach wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit einer Dextran-1-haltigen Lösung bedeckt. Die Zellen wurden unter Vorhandensein von Dextran-1 (Tetramethylrhodamin, Endkonzentration $500\mu\text{g/ml}$) mit Glaskügelchen besprenkelt. Anschließend wurden die Glaskügelchen durch 5faches horizontales Bewegen über den gesamten Zellrasen geführt. Nach einer Resealing-Zeit von 3 Min. wurden das extrazelluläre Dextran-1 und die Glaskügelchen von der Zellkulturplatte durch zwei Waschschriffe entfernt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 1 Min. mit einer Dextran-2-haltigen Lösung (Texas Red, Endkonzentration $500\mu\text{g/ml}$) inkubiert und zweimal gewaschen, um das Dextran-2 vollständig zu entfernen. Die Auswertung des Resealing-Verhaltens der Zellen wurde mittels konfokaler Laserscanmikroskopie durchgeführt.

II.2.1.4. Streptolysin O (SLO)-Schädigung der Zellmembran

Es wurden (wie beschrieben) am Vortag jeweils 2.5×10^5 CHO-Zellen auf μ Dishes ausgesät (Kap. II.2.1.1).

Zur Markierung der Plasmamembran wurde FM4-64 verwendet. Dieser Fluorophor interkaliert in die Plasmamembrandoppelschicht, ist allerdings nicht in der Lage diese zu durchdringen. Da der Marker FM4-64 nur unter hydrophoben Umgebungsbedingungen fluoresziert, wird das emittierte Signal erst nach dem Interkalieren in die Plasmamembran sichtbar. Durch diese speziellen Fluoreszenzeigenschaften eignet sich FM4-64 besonders für Experimente der Online-Beobachtung nach Zugabe von Toxinen. Die CHO-Zellen wurden

mit einer 1mM Ca^{++} /PBS-Lösung inkubiert, welche 5 μ M FM4-64 und SLO (Endkonzentration 200Units/ml) enthielt. Unmittelbar vor der Zugabe dieser Lösung wurde die Aufnahme der Zeitserie (1 Bild alle 5 Sek.) gestartet. Durch das nach Zugabe stattfindende Interkalieren des Markers in die Plasmamembran und das unmittelbar auftretende Fluoreszenzsignal, war die exakte Definierung des Punktes 0 der Zeitserie möglich.

II.2.2. Konfokal mikroskopische Untersuchungen

II.2.2.1. Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie (kLSM)

Die kLSM basiert auf der Fluoreszenzmikroskopie, wobei im Unterschied zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie ein Laser als fokussierbare Lichtquelle fungiert, welche das zu mikroskopierende Objekt Punkt für Punkt in einer Ebene abtastet und ausschließlich die im Fokus befindlichen Fluoreszenzmoleküle anregt. Im Strahlengang des Mikroskops ist eine Lochblende (Pinhole) eingebracht, wodurch die außerhalb der Fokusebene vom Objekt reflektierte Strahlung ausgeblendet werden kann. Das bewirkt eine Auflösungssteigerung in der Z-Achse. Die Detektion der vom fluoreszenzgefärbten Präparat emittierten Strahlung erfolgt über einen Photomultiplier. Durch das punktweise Rastern des Präparates kann keine Gesamtdarstellung des Präparates ermittelt werden. Daher ist anhand der Messung der Fluoreszenzintensitäten eine anschließende Rekonstruktion des Bildes mittels Computer erforderlich. Durch die Registrierung von Signalen in verschiedenen Fokusebenen wird eine ebenfalls computergestützte dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen möglich. Das ist besonders bei der hier analysierten Translokation intrazellulärer Zellkomponenten an die Plasmamembran von Interesse.

Das verwendete konfokale Laserscanmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) basiert auf einem Axiovert 200MOT. Es ist ausgestattet mit einem Argonlaser (458, 477, 488, 514 nm; 30 mW) und drei verschiedenen HeNe-Lasern (543 nm, 1 mW; 594 nm, 2 mW; 633 nm, 5 mW). Je nachdem welche Fluorophore in den Experimenten Anwendung fanden, wurden die entsprechenden Laser- und Filtereinstellungen gewählt und mittels einer Positiv- und Negativ-Kontrollen optimal eingestellt. Die Aufnahme von Stapelbildern von Zell- oder Gewebepreparaten erfolgte standardisiert in einem Abstand von 0,5 μ m.

II.2.2.2. Proteinnachweis durch Antikörper

Der Nachweis spezifischer Proteine an der geschädigten Zellmembran wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen geschädigt (Kap. II.2.1.3 und II.2.1.4) und anschließend mit einer 0,5%igen Formaldehyd-Lösung für 5 Min. fixiert. Die Zellen wurden danach für 15 Min. mit dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper (Endkonzentration 1µg/ml) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, der dazu diente den ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen unmittelbar mittels kLSM analysiert.

II.2.2.3. Fluoreszenzmarkierung der Antikörper

Die in den Resealing-Experimenten verwendeten Antikörper und Isotyp-Kontrollantikörper wurden für die Darstellung in der Konfokalmikroskopie mit einem Fluorophor gekoppelt. Mittels Entsalzungssäulen (Desalting Spin Columns) wurden die Antikörper zuvor in PBS umgepuffert, um störende Amine und Ammoniumsalze zu entfernen. Die Konjugation des Antikörpers mit dem Fluorophor erfolgte nach den Herstellerangaben (Invitrogen). Hierzu wurde ein in DMSO gelöster Fluorophor für 1 Std. unter stetigem Rühren mit dem jeweiligen zu markierenden Antikörper inkubiert. Der ungebundene Fluorophor wurde durch Dialyse gegen eine PBS-Lösung oder durch Entsalzungssäulen entfernt.

II.2.2.4. Transfektion mit Lipofectamine2000

2.5×10^5 CHO-Zellen wurden am Vortag auf Zellkulturplatten (µDishes, Ibidi) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden das Medium entfernt und den Zellen Optimem-Medium (ohne Antibiotika und FBS) zugeführt. Im Allgemeinen wurde 1µg des für die Transfektion verwendeten Plasmides mit 5µl Lipofectamine2000 (Invitrogen) in 100µl Optimem-Medium für 30 Min. inkubiert. Der Liposome-DNA Komplex wurde tropfenweise auf die CHO-Zellen gegeben. Nach 5 Min. wurden weitere 650µl Optimem-Medium auf die Zelldishes gegeben, um ein ausreichendes Mediumvolumen auf den µDishes zu erhalten. Nach 6 Std. wurde das Optimem-Medium gegen DMEM-Medium ausgetauscht, welches 5% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin beinhaltet. 24 Std. nach der erfolgten Transfektion wurden die Zellen für die Resealing-Experimente verwendet.

II.2.2.5. Zeitabhängige Translokationsanalyse von Zellkomponentenmarkern nach SLO-Schädigung

Zunächst wurde eine Transfektion der CHO-Zellen mit verschiedenen Fluorophor-gekoppelten Plasmiden durchgeführt (Tab. II.1.5).

Nach dem Einbau der fluoreszenzgekoppelten Plasmide in das Genom der Zellen exprimierten diese markierte Proteine, die sich konfokalmikroskopisch darstellen ließen. Durch eine spezielle Software (LSM 510 Release 4.0, Zeiss) war es möglich, die zeitabhängige Akkumulierung des fluoreszenzgekoppelten Markerproteins innerhalb eines bestimmten Areal (Region of Interest, ROI) zu untersuchen. Dadurch wurde es auch möglich, Daten über die Veränderung der Fluoreszenzintensität innerhalb dieser Regionen zu ermitteln. Um die Translokation der markierten Proteine an der Zellmembran zu untersuchen, wurden auf die mittels FM4-64 definierten Zellmembran 5 ROIs gelegt und die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten in diesem Bereich über einen Zeitraum von 300 Sek. nach SLO-Zugabe analysiert.

II.2.3. Translokation von ER-Vesikeln an Verletzungsstellen *in vivo*

An einem transgenen Tiermodell wurde die Translokation von ER-Vesikeln an die verletzten Axonenden nach einer axonalen Transection (Axotomy) untersucht (Misgeld & Kerschensteiner 2006). Die verwendeten transgenen *Thy1-YFP* Mäuse exprimieren im Cytoplasma ihrer Neurone ein gelb fluoreszierendes Protein, welches unter der Kontrolle eines modifizierten Thp1-Promotor Elementes exprimiert wird.

Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert und das Rückenmark freigelegt. Durch einen transversalen Schnitt mit einem Skalpell wurde ein Drittel des Rückenmarks verletzt. Die Wunde wurde wieder verschlossen und nach einer Regenerationzeit von 20 Min. wurden die Tiere euthanisiert. Den Tieren wurde zur Fixierung Paraformaldehyd (PFA) infundiert und das geschädigte Rückenmarksareal explantiert. Nach 24 Std. in PFA wurden die Proben über Sucrose äquilibriert (4 d, 4°C).

Von den Proben wurden Cryoschnitte angefertigt, welche nach einer Fixierung mit Methanol-Eisessig immunhistologisch weiterbearbeitet wurden. Nach der Blockade unspezifischer Bindestellen wurden die Schnitte über Nacht mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper (5µg/ml Endkonzentration in PBS, bei RT) gegen verschiedene ER-Proteine, sowie einer ebenfalls fluoreszenzmarkierten Isotyp-Kontrolle inkubiert. Die Auswertung der Cryoschnitte erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

II.2.4. MP-Experimente

II.2.4.1. Primärzell-Isolierung

II.2.4.1.1. Blutentnahme

Periphär-venöses Blut gesunder Spender wurde aus der Cubitalvene in Tri-Natriumcitrat (0.38% Endkonzentration) und Hirudin (1µg/ml Endkonzentration) enthaltende Spritzen überführt.

II.2.4.1.2. Isolierung humaner Monozyten

Nach der Zentrifugation des gewonnenen Vollblutes (180 x g, 15 Min.) erfolgte die Entnahme des leukozytenhaltigen Buffy Coat. Die Auftrennung der Leukozytensuspension erfolgte über einen Ficoll-Gradienten und einem damit verbundenen Zentrifugationsschritt (280 x g, 25 Min.). Nach zwei weiteren Waschschritten mit Monozytenwaschpuffer erfolgt die Inkubation der Zellsuspension mit Magnetbead-gekoppelten anti-CD14 Antikörper (15 Min., 4°C). Die in der Zellsuspension enthaltenen CD14-positiven Monozyten wurden in einer Mini-MACS-Säule, welche mit einem Magneten gekoppelt war, gebunden. Die Säulen wurden anschließend mehrfach mit Antikörper-Puffer gewaschen. Nach der Trennung vom Magneten war das Auswaschen der Monozyten aus den Säulen möglich. Nach einer weiteren Zentrifugation (210 x g, 10 Min.) wurde das Pellet in Resuspensionspuffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

II.2.4.2. Makrophagendifferenzierung *in vitro*

Neben den isolierten Primärzellen wurden bei den Experimenten zur Mikropartikel-Aufnahme als Akzeptorzellen auch Makrophagen verwendet. Hierzu wurde die humane monozytäre THP-1-Zelllinie (DSMZ ACC 16; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) durch eine PMA-Stimulierung (Phorbol 12-myristate 13-Acetat) zu Makrophagen differenziert (Schulte *et al.* 2006). Im Unterschied zu Primärzellen eignet sich diese Zellkulturlinie besonders für Inkubationsexperimente über längere Zeiträume. Die THP-1-Zellen ($2,5 \times 10^5$) wurden auf µDishes mit 75ng PMA für 30 Std. bei 37°C stimuliert. Nach 24 Std. erfolgte ein Mediumwechsel. Das dafür verwendete RPMI 1640 Medium enthält neben 10% FBS und 5% Penicilin/Streptomycin zusätzlich 10mM HEPES.

II.2.4.3. MP-Isolierung

II.2.4.3.1. Isolierung humaner zirkulierender MP

Das entnommene Vollblut wurde unverzüglich aufgearbeitet und für 15 Min. bei 268 x g zentrifugiert. Das thrombozytenreiche Plasma wurde für 20 Min. bei 1430 x g zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und ein weiteres Mal zentrifugiert (1430 x g, 20 Min.) um das thrombozytenfreie Plasma zu erhalten. Der Überstand wurde zu je 250µl aliquotiert und die darin enthaltenen MP wurden für 30 Min. bei 17750 x g zentrifugiert. Die dadurch erhaltenen MP-Pellets wurden in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert (17740 x g, 30 Min.) und in Resuspensionspuffer wieder aufgenommen und systematisch vereint.

II.2.4.3.2. Isolierung humaner thrombozytärer MP

Aus dem entnommenen Vollblut (Kap. II.2.4.1.1) wurde nach einem Zentrifugationsschritt (180 x g, 15 Min.) vorsichtig das thrombozytenreiche Plasma abgenommen. Nach der Zugabe der Thrombozytenaggregationshemmer Iloprost (Endkonzentration 1µg/ml) und Apyrase (Endkonzentration 4µl/ml) erfolgte eine erneute Zentrifugation (1430 x g, 20 Min.). Das erhaltene Thrombozytenpellet wurde in Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (1430 x g, 20 Min.) und schließlich in Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Thrombozyten für 15 Min. bei 37°C mit Kollagen (Typ I, Endkonzentration 12µg/ml) stimuliert. Die während der Stimulierung in den Überstand sezernierten MP wurden über weitere Zentrifugationsschritte isoliert. In Aliquots von 250µl wurde der Überstand für 30 Min. bei 17740 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets wurden wieder in Resuspensionspuffer aufgenommen und systematisch vereint.

II.2.4.3.3. Isolierung von MP aus karzinomatösen Zelllinien

Zur Untersuchung der Internalisierung verschiedener MP-Populationen in humane Monozyten wurden neben humanen thrombozytären und zirkulierenden MP ebenso MP von Pankreaskarzinom-Zelllinien isoliert und inkubiert. Die beiden Zelllinien wurden aus der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie COLO 357 generiert (Bruns *et al.* 1999). Sie unterscheiden sich in ihren metastasierenden Eigenschaften.

Die FG-Zelllinie stellt eine schnell wachsende Variante der COLO357 Zellen dar (FG = fast growing), welche keine Metastasen induziert. Um das metastatische Potential dieser Zellen zu steigern, wurden diese in das Pankreas von Nacktmäusen injiziert. Aus den so generierten

Lebermetastasen wurden Tumorzellen isoliert und wiederum in das Pankreas injiziert. Nach einer 6fachen Wiederholung dieser Zyklen erhielt man die stark maligne Zelllinie L3.6pl. Die FG- und L3.6pl-Zelllinien wurden bei 37°C in einer 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellen sezernieren konstitutiv MP in den Medienüberstand. Aus den Zellkulturflaschen wurden das Medium entnommen und über weitere Zentrifugationsschritte die MP daraus isoliert. Die Entfernung von Zellfragmenten erfolgte über eine zweimalige Zentrifugation des Überstandes (jeweils bei 1430 x g, 20 Min.). Das dabei entstandene Pellet wurde verworfen. Die zellfreie Lösung wurde zu jeweils 250µl aliquotiert und für 30 Min. bei 17740 x g zentrifugiert. Die dadurch gewonnenen MP-Pellets wurden in Resuspensionspuffer wieder aufgenommen, systematisch vereint und eine Proteinbestimmung durchgeführt (Kap. II.2.5).

II.2.4.3.4. Isolierung von TF-CFP-positiven MP aus verschiedenen Zelllinien

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien von FG und L3.6pl sowie CHO-Zellen (je 3×10^7 Zellen pro Ansatz) wurden wie im Kapitel II.2.2.4 beschrieben mit einem TF-CFP-Plasmid in Zellkulturflaschen transfiziert. Die darauffolgende MP-Isolierung wurde bei allen drei verschiedenen Zelllinien identisch durchgeführt. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion (Transfektionsrate mindestens 90%) wurden die Zellen mittels eines Zellkulturschabers in Kulturmedium mechanisch stimuliert und nach 30 Min. der Zellüberstand entnommen. Die Entfernung von Zellfragmenten erfolgte über eine zweimalige Zentrifugation des Überstandes (jeweils bei 1430 x g, 20 Min.). Das dabei entstandene Pellet wurde verworfen. Die zellfreie Lösung wurde zu jeweils 250µl aliquotiert und für 30 Min. bei 17740 x g zentrifugiert. Die dadurch gewonnenen MP-Pellets wurden in Resuspensionspuffer wieder aufgenommen und systematisch vereint. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

In Vorversuchen wurde mittels einer FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) die Mikropartikelmenge bestimmt und gleichzeitig eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dabei entsprach 1µg MP-Protein ca. 4000 MP.

II.2.4.3.5. Fluoreszenzmarkierung der MP

Die MP wurden mit 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate (DCF, 1:100 Verdünnung der Stammlösung) für 2 Min. markiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und eine weitere Zentrifugation (17740 x g, 30 Min.), um extrazelluläres DCF zu entfernen.

II.2.4.4. MP-Inkubation mit Akzeptorzellen

Um die an der MP-Clearance beteiligten Mechanismen zu analysieren, wurden Akzeptorzellen im Verhältnis 1 zu 50 mit den verschiedenen MP-Populationen inkubiert.

II.2.4.4.1. MP-Inkubation mit Monozyten

1×10^5 der unmittelbar zuvor isolierten Monozyten (Kap. II.2.4.1.2) wurden mit dem Membranmarker Vybrant DiD (4 μ l Stammlösung in 1ml Resuspensionspuffer, 37°C) für 15 Min. angefärbt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit Resuspensionspuffer. Die membranmarkierten Monozyten wurden mit verschiedenen DCF-markierten MP-Populationen über verschiedene Zeiträume (0, 10, 30 und 60 Min.) bei 37°C in Resuspensionspuffer inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (210 x g, 10 Min.), um die nicht aufgenommenen MP zu entfernen. Die Zunahme der intrazellulären MP-Fluoreszenz wurde mittels definierter ROI berechnet, wobei der Plasmamembranmarker Vybrant DiD verwendet wurde, um die Zellgrenzen zu visualisieren.

II.2.4.4.2. MP-Inkubation mit Makrophagen

1×10^5 der unmittelbar zuvor zu Makrophagen stimulierten THP-1-Zellen (Kap. II.2.4.2) wurden mit dem Membranmarker Vybrant DiD (4 μ l Stammlösung in 1ml Resuspensionspuffer, 37°C) für 15 Min. angefärbt. Es erfolgte ein Waschschriff mit Zellkulturmedium. Die membranmarkierten Makrophagen wurden mit verschiedenen DCF-markierten MP-Populationen über unterschiedliche Zeiträume (0, 10 und 60 Min.) bei 37°C in Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschriff mit Resuspensionspuffer um die nicht aufgenommenen MP zu entfernen. Die Zunahme der von den MP stammenden Fluoreszenz innerhalb der Makrophagen wurde durch eine ROI berechnet, welche anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert wurde.

Für die Durchführung von Experimenten zu Rezeptorabhängigkeit der MP-Internalisierung, wurden die Makrophagen vor der MP-Inkubation für 15 Min. mit einem anti-CD-36-Antikörper (5 μ g/ml Endkonzentration) vorinkubiert. Durch einen Waschschriff wurde der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand entfernt und die oben erwähnte MP-Inkubation durchgeführt.

II.2.4.5. MP-Clearance *in vivo*

II.2.4.5.1. Isolierung zirkulierender muriner MP

C57 black 6 Mäusen wurden durch intraperitoneale Injektion einer Kombinationsnarkose aus Midazolam (5mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (0.5mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0.05mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Den Tieren wurde intrakardial Blut entnommen und in Tri-Natriumcitrat (0.38% Endkonzentration) und Hirudin (1µg/ml Endkonzentration) enthaltende Spritzen überführt, anschließend wurden die Tiere euthanasiert. Nach der Zentrifugation des Vollblutes (268 x g, 15 Min.) wurde das thrombozytenreiche Plasma erneut für 20 Min. bei 1430 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und ein weiteres Mal zentrifugiert (1430 x g, 20 Min.), um thrombozytenfreies Plasma zu erhalten. Nach der Aliquotierung des Plasmas in 250µl Portionen, wurden die Proben für 30 Min. bei 17740 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen MP-Pellets wurden in Resuspensionpuffer wieder aufgenommen und vereint. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (17740 x g, 30 Min.) und der Proteinbestimmung wurden die MP zu je 25µg portioniert (entspricht 1×10^5 MP).

II.2.4.5.2. Radioaktiv-Markierung der murinen MP

Die isolierten murinen MP (jeweils 25µg) wurden mit 1MBq 111 Indium-Oxinat radioaktiv markiert (30 Min. bei 37°C). Um nicht gebundenen Radioaktivmarker zu entfernen wurden die MP anschließenden zentrifugiert (17740 x g, 30 Min.) und der Überstand verworfen. Nach der Resuspendierung der MP in sterilem PBS erfolgte ihre Applikation in die Versuchstiere.

II.2.4.5.3. Applikation radioaktiv-markierter MP in wt und CD36^{-/-}-Mäusen

Um die im Kapitel III.2.3. *in vitro* beschriebene Abhängigkeit der MP-Clearance von CD36-positiven Zellen zu untersuchen, wurden MP-Clearance-Analysen an CD36-defizienten Mäusen (CD36^{-/-}) und Wildtyp-Tieren (wt) desselben Inzuchtstammes (C57Bl6) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer Kombinationsnarkose aus Midazolam (5mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (0.5mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0.05mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend erfolgte die MP-Applikation von jeweils 25µg radioaktiv-markierten MP in einer PBS-Lösung über einen in der Arteria carotis liegenden Katheter. Nach 20 Min. wurden die Tiere euthanasiert

und anschließend die Organe explantiert. Nach der Bestimmung der Probengewichte wurde die radioaktive Emission der MP in den verschiedenen Organen mit einem Gamma Counter gemessen.

II.2.5. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Proben wurde unter Verwendung eines *RC DC*TM Protein Assay Kits der Firma Bio-Rad photometrisch ermittelt. Dieser Test basiert auf einem modifizierten Protokoll nach Lowry (Lowry *et al.* 1951).

Die in der Lösung A enthaltenen Kupferionen gehen eine Komplexbildung mit den in der Probe enthaltenen Proteinen ein, welcher durch die Zugabe einer Lösung B (Folin-Phenol-haltige Reagenz) reduziert wird. Die resultierende Farbveränderung (stabil nach 12 Min. Inkubation) kann bei 700nm photometrisch analysiert werden. Unter Bezugnahme auf eine BSA-Standardkurve kann der Proteingehalt quantifiziert werden.

II.2.6. Auswertung und Statistik

Die quantitative Analyse der kLSM-Aufnahmen wurde mit der Software LSM 510 Release 4.0 (Zeiss) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software SigmaStatTM 3.5. Die unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden mittels des ONE WAY ANOVA-Test verglichen. $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bezeichnet.

III. Ergebnisse

III.1. Resealing-Verhalten von Zellen und die beteiligten Vesikel *in vitro*

III.1.1. Bedeutung von Ca^{++} für die Membranreparatur

Um unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die Abhängigkeit der Membranreparatur von der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration zu überprüfen, wurden CHO-Zellen in Anwesenheit einer 1mM Ca^{++} -Lösung mit Glaskügelchen geschädigt. Als Kontrolle wurden die Zellen in Anwesenheit einer 5mM EGTA ((Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid))-Lösung geschädigt. Abb.4 und Abb.5 zeigen, dass die Membranreparatur in der Tat von extrazellulärem Ca^{++} abhängig ist. In Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{++} werden deutlich mehr RC gefunden (Dextran-1 positive Zellen) als in dessen Abwesenheit. In letzterem Falle sind die meisten Zellen Dextran-1 plus Dextran-2 positiv, dies klassifiziert die Zellen als Non-RC.

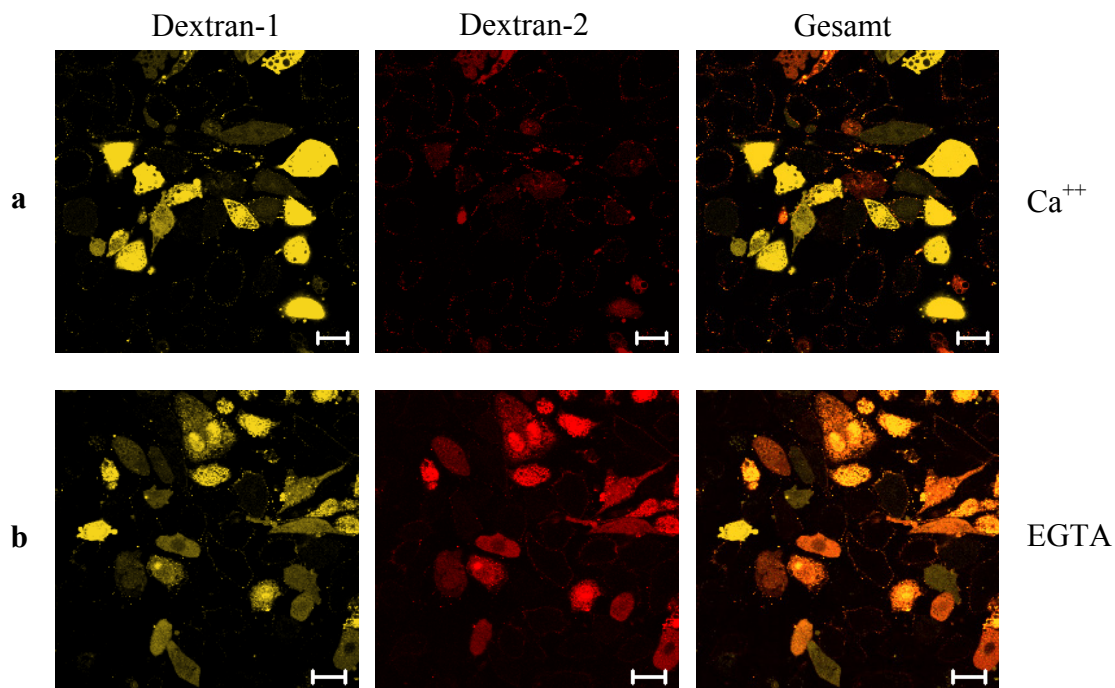


Abb.4 Veränderung des Resealing-Verhaltens in Abhängigkeit von Ca^{++}

a) CHO-Zellen wurden in einer 1mM Ca^{++} -Lösung bzw.

b) in einer 5mM EGTA-Lösung mittels Glaskügelchen geschädigt. Grössenindikator = 20 μm .

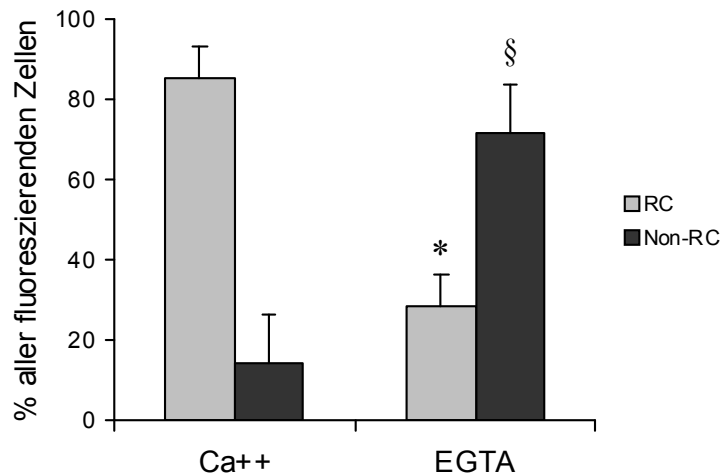


Abb.5 Quantitative Darstellung des veränderten Resealing-Verhalten von CHO-Zellen in Abhängigkeit der extrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration.

CHO-Zellen wurden mit Glaskügelchen unter der Einwirkung von Ca⁺⁺-haltiger und Ca⁺⁺-freier Lösung geschädigt. Ca⁺⁺ n=8, EGTA n=4, Mittelwerte ±S.D. *p<0.005 RC Ca⁺⁺ vs. RC EGTA, §p<0.005 non RC Ca⁺⁺ vs. nonRC EGTA. One Way ANOVA for multiple comparisons.

Es konnte gezeigt werden, dass die Resealing-Fähigkeit der CHO-Zellen durch den Entzug des extrazellulär verfügbaren Ca⁺⁺ signifikant reduziert wird und somit die Membranreparatur unter den gegebenen Bedingungen Ca⁺⁺-abhängig ist.

III.1.1.1. Nachweis verschiedener ER-Proteine an Verletzungsstellen der RC

Wie in Abb.6 ersichtlich, wird an den Verletzungsstellen der Plasmamembran typischerweise eine verminderte Fluoreszenzintensität des intrazellulären cytosolischen Markers Dextran-1 beobachtet. Dies geht mit einer vermehrten Vesikelakkumulation an dieser Stelle einher. Da ER-Membranen das größte intrazelluläre Membranreservoir darstellen, wurde nach Zellschädigung untersucht, ob die RC ER-spezifische Proteine an den Verletzungsstellen exponieren. Hierzu wurden Alexa488-konjugierte Antikörper eingesetzt, die ER-spezifische Proteine detektieren (Abb.6 und Abb.7). Um die spezifische Bindung der verwendeten Antikörper nachzuweisen wurden auch unbehandelte Zellen als Kontrolle mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Ebenso wurden nach Schädigung Alexa488-konjugierte Kontroll-Antikörper desselben Isotyps untersucht.

Man erkennt in den umrandeten Arealen in Abb.6 und Abb.7 die oben erwähnte typische Veränderung der cytosolischen Dextran-Fluoreszenz an der Verletzungsstelle. Es ist eine deutliche Signalüberlagerung der fluoreszierenden gegen ER-Proteine gerichteten Antikörper (Abb.6b und Abb.7b) mit der Verletzungsstelle der Plasmamembran zu erkennen.

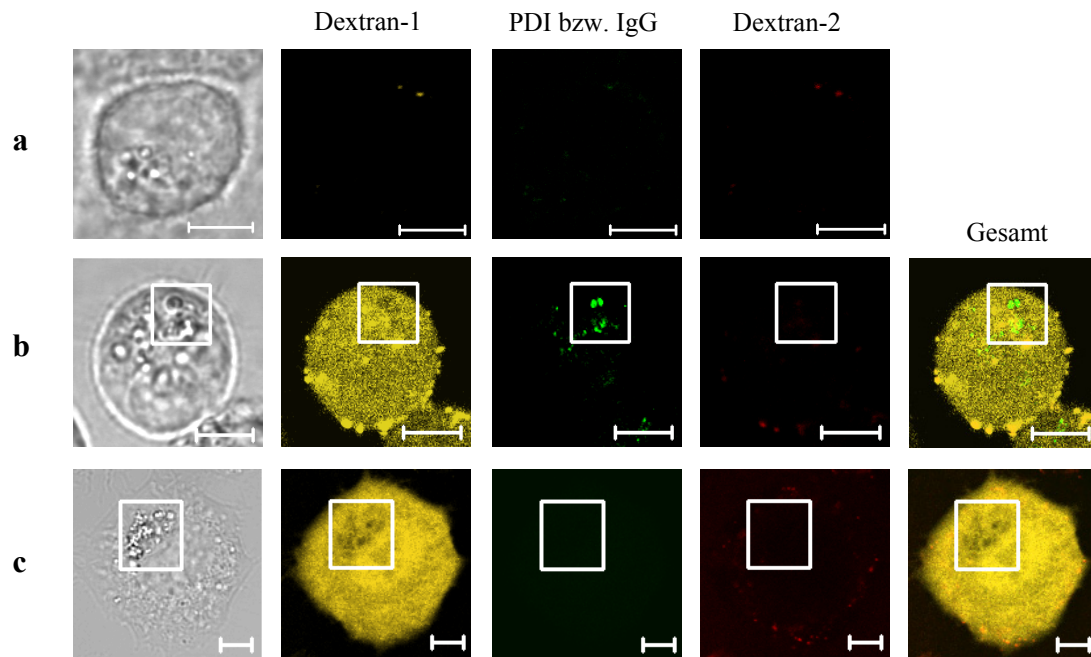


Abb.6 Nachweis von PDI an der Verletzungsstelle von RC

a) ohne Schädigung

b) mit Glaskügelchen geschädigte Zellen, die anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten spezifischen anti-PDI-AK (grün) behandelt wurden

c) mit Glaskügelchen geschädigte Zellen, die anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Isotyp-AK (grün) inkubiert wurden. Die Rahmen geben Verletzungsstellen an. Grössenindikator = 5µm

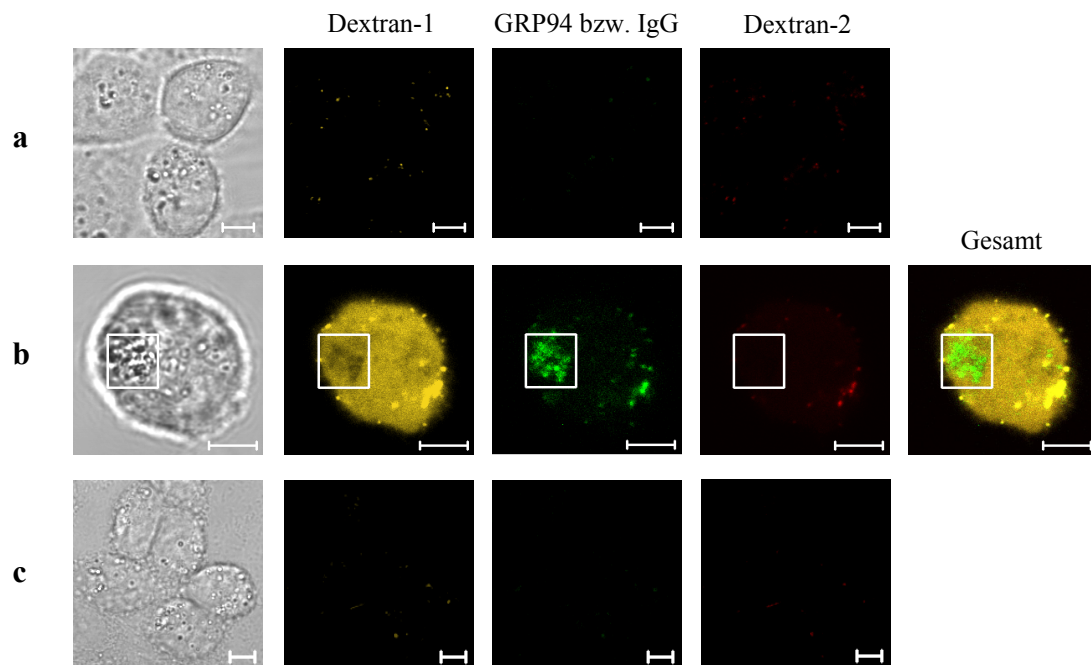


Abb.7 Nachweis von GRP94 an der Verletzungsstelle der RC

a) ohne Schädigung

b) mit Glaskügelchen geschädigte Zellen, die anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten spezifischen anti-GRP94-AK (grün) behandelt wurden

c) mit Glaskügelchen geschädigte Zellen, die anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Isotyp-AK (grün) inkubiert wurden. Rahmen geben Verletzungsstellen an. Grössenindikator = 5µm

Bei den in Abb.6b und Abb.7b detektierten Proteinen PDI und GRP94 handelt es sich um lösliche, im Lumen des ER befindliche Proteine. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob auch Membranproteine des ER an den Verletzungsstellen der RC nachweisbar sind. Dabei wurde das transmembranöse ER-Protein Calnexin (CNX) untersucht. CNX weist eine cytoplasmatische und luminal Domäne auf, die mittels spezifisch bindender Antikörpern detektiert werden können.

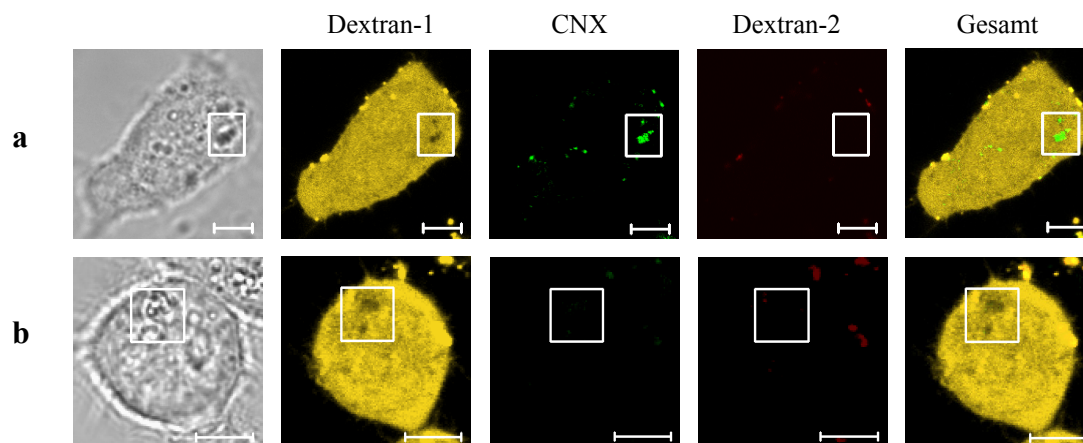


Abb.8 Exposition der luminalen bzw. cytoplasmatischen Domäne des transmembranösen ER-Proteins Calnexin auf RC

CHO-Zellen wurden mit Glaskügelchen geschädigt und anschließend mit einem **a)** luminal bzw. **b)** cytoplasmatisch bindenden fluoreszenzmarkierten anti-CNX-Antikörper (grün) inkubiert. Rahmen geben Verletzungsstellen an. Grössenindikator = 5µm

An der Verletzungsstelle der RC konnte eine Exposition der luminalen Domäne von CNX nachgewiesen werden (Abb.8). Hingegen war die cytoplasmatische Domäne von CNX nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse konnten auch an humanen Fibroblasten bestätigt werden. Auch dort wurde im Bereich der Membranschädigung bei erfolgreich regenerierten Zellen die luminal Domäne von CNX exponiert (Abb.9).

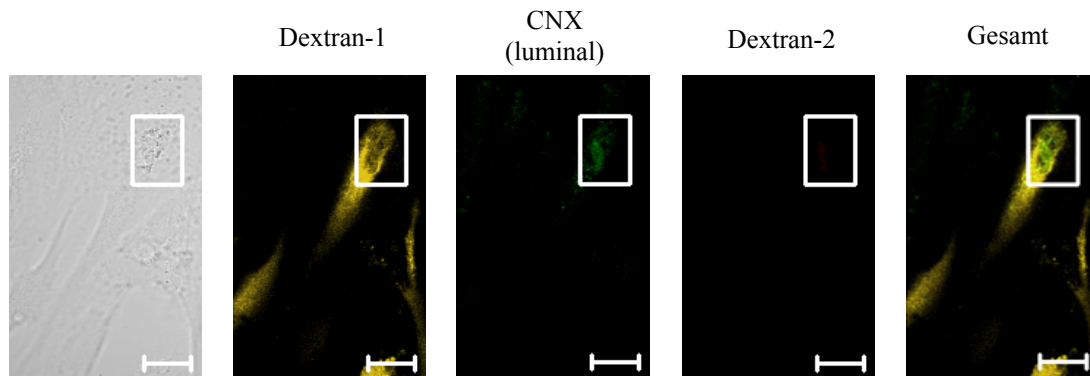


Abb.9 Exposition der luminalen Domäne von CNX an erfolgreich regenerierten Fibroblasten

Humane Hautfibroblasten wurden durch Glaskügelchen verletzt und das Resealing-Verhalten mittels verschiedener Dextrane nachgewiesen. Die luminal Domäne von CNX wurde an der Verletzungsstelle der Fibroblasten durch spezifische fluoreszenz-konjugierte Antikörper (grün) detektiert (eingerahmter Bereich). Grössenindikator = 20 μm

III.1.1.1.1. Ca^{++} -Abhängigkeit der Exposition von ER-Proteinen an der Verletzungsstelle

Um die Ca^{++} -Abhängigkeit der Exposition von ER-Proteinen zu testen, wurden CHO-Zellen in einer Ca^{++} -haltigen oder Ca^{++} -freien Lösung geschädigt. Anschließend wurde die Exposition der luminalen CNX-Domäne an den Verletzungsstellen der RC untersucht (Abb.10).

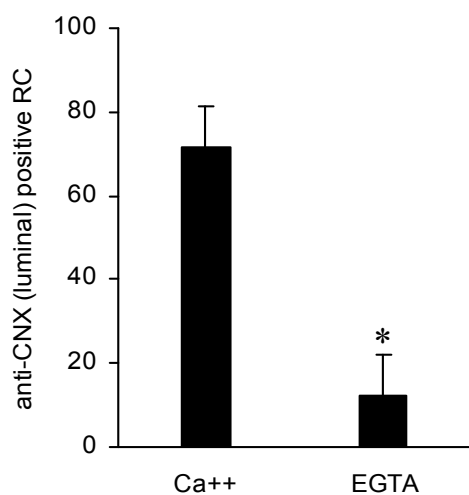


Abb.10 Exposition der luminalen Domäne von CNX auf RC in Abhängigkeit von Ca^{++}

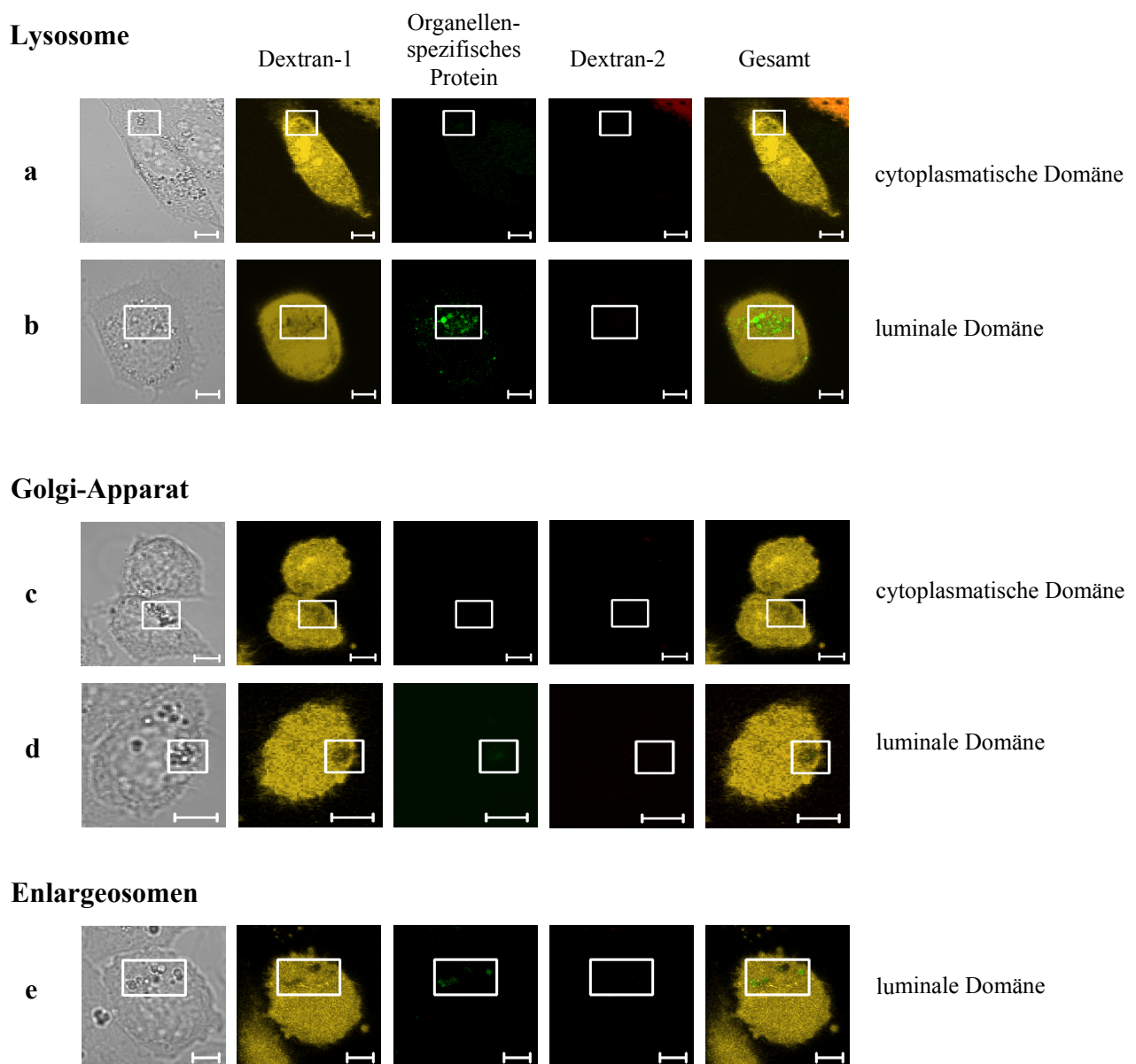
CHO-Zellen wurden in Ca^{++} -Lösung (1mM) oder EGTA-Lösung (5mM) mit Glaskügelchen geschädigt. Mittels verschiedener Dextrane wurde ein erfolgreiches Resealing ermittelt. Gleichzeitig wurde die Exposition der luminalen Domäne von CNX analysiert. Die Prozentsätze geben den Anteil an Antikörper-positiven Zellen der gesamten RC an. Mittelwerte \pm S.D. Analysen an > 100 Zellen in 3 Experimenten. * $p < 0.05$. Unabhängiger t-Test.

Ca^{++} -Depletion des extrazellulären Mediums induzierte eine signifikante Verminderung der Exposition von ER-Proteinen an den Verletzungsstellen von RC (Abb.10).

III.1.1.2. Präsentation von Zellorganellen-spezifischen Markerproteinen an den Verletzungsstellen von RC

III.1.1.2.1. Freisetzung spezifischer Organellenmarker nach Schädigung

Um die Beteiligung anderer Zellorganellen mit derjenigen von ER-Membranen an der Membranreparatur zu vergleichen, wurden geschädigte CHO-Zellen auf die Exposition spezifischer Markerproteine für verschiedene Zellorganellen untersucht. Zur Detektion wurden luminal- oder cytoplasmatisch-bindende Antikörper verwendet. Im Einzelnen wurden Marker für Lysosomen (Abb.11a und b), den Golgi-Apparat (Abb.11c und d), Enlargeosomen (Abb.11e) sowie das ER (Abb.11f und g) verwendet.



ER

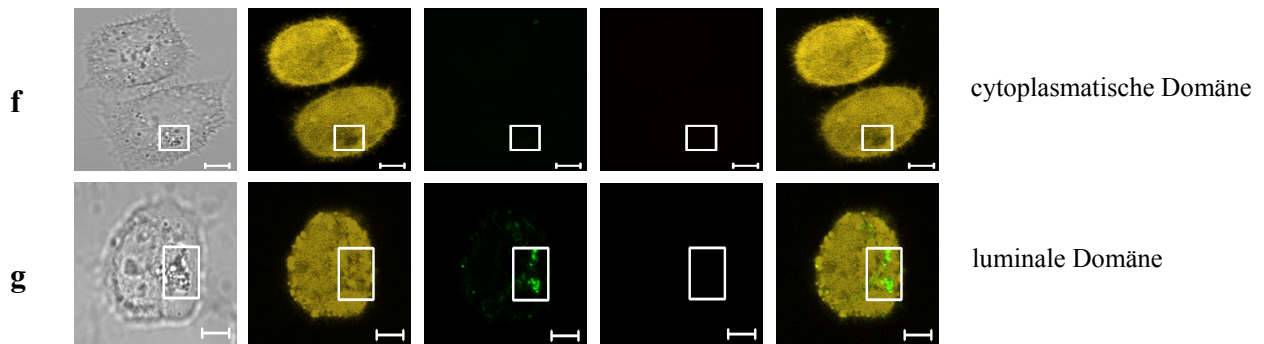


Abb.11 Präsentation von spezifischen Markerproteinen für intrazelluläre Organellen an Verletzungsstellen in RC.

CHO-Zellen wurden durch Glaskügelchen verletzt und anschließend ihr Resealing-Verhalten überprüft (insges. 15 Min. nach Verletzung). Die Zellen sind Dextran-1(+) und Dextran-2(-) und stellen daher RC dar. Die eingerahmten Bereiche zeigen die Verletzungsstellen an, die charakteristischerweise eine Vesikelakkumulation und eine reduzierte Dextran-1-Markierung zeigen. Die angegebenen Proteine wurden mittels Alexa488-markierter Antikörper (grün) nachgewiesen. Sie stellen Marker für Lysosomen (LAMP-1, **a** cytoplasmatische, **b** luminal Domäne), des Golgi-Apparate (**c** Golgi K58 →cytoplasmatische Domäne, **d** Mannosidase II →luminal Domäne), Enlargeosomen (**e** AHNAK→luminal Domäne) und das ER dar (CNX, **f**→cytoplasmatische Domäne, **g**→luminal Domäne). Grössenindikator = 5 μ m.

Wie die quantitativen Analysen in Abb.12 zeigen, sind die luminalen Domänen der lysosomalen und der ER- Markerproteine an der Schädigungsstelle der Membran stärker exponiert als die jeweiligen cytoplasmatischen Marker. Die Detektierbarkeit der luminalen Proteindomänen deutet daraufhin, dass im betroffenen Areal eine Fusion der Organellen-Membranen mit der Zellmembran nach einer Schädigung stattfindet.

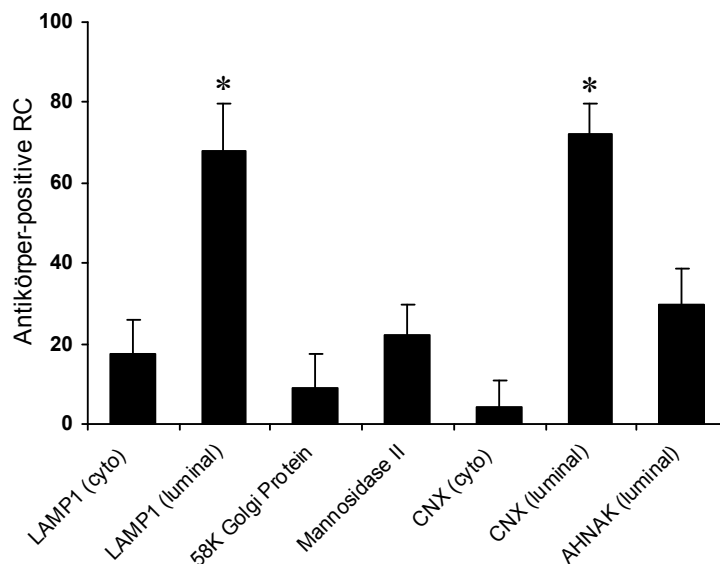


Abb.12 Exposition von spezifischen Markerproteinen für intrazelluläre Organellen an Verletzungsstellen in RC.

CHO-Zellen wurden durch Glaskügelchen verletzt und anschließend ihr Resealing-Verhalten mittels verschiedener Dextrane überprüft. Die Prozentsätze geben den Anteil an Antikörper-positiven Zellen an allen RC an (> 50 Zellen in allen Fällen). Mittelwerte \pm S.D. *p < 0.05 vs. alle anderen Antikörper, abgesehen von LAMP-1 (luminal) vs. CNX (luminal). One Way ANOVA for multiple comparisons.

III.1.1.2.2. Zeitabhängige Exposition spezifischer Organellenmarker nach Schädigung der Membran mittels Toxinen

Um die Bedeutung von lysosomalen Vesikeln, Enlargeosomen und ER-Vesikeln an der Membranreparatur weiter zu überprüfen, wurden die Zellmembranen selektiv mittels Streptolysin O (SLO) geschädigt. Dieses Toxin induziert Poren in der Zellmembran (Porengrösse = \sim 30nm), die durch verschiedene Membranreparaturmechanismen wiederverschlossen werden.

Die verschiedenen Organellen wurden durch Transfektion mit fluoreszenzmarkierten Plasmiden (Abb.13, blau dargestellt) sichtbar gemacht. Parallel dazu wurde die Zellmembran mit einem Membranmarker visualisiert (Abb.13, rot dargestellt). Die Zellen wurden anschließend mit SLO inkubiert. Abb.13 zeigt einen horizontalen Querschnitt der Zellen zum Zeitpunkt 0 und 300 Sek. nach Beginn der Inkubation mit SLO.

Nach 300 Sek. wird eine deutliche Verlagerung der Organellen-spezifischen Marker für Lysosomen, Enlargeosomen und ER-Proteinen an die Plasmamembran beobachtet (Abb.13a, d, e). In der Tat kommt es zur Überlagerung der Peaks des Plasmamembranmarkers mit dem jeweiligen Organellenmarker. Im Gegensatz dazu ist keine Verlagerung des Golgi-Markers und des mitochondrialen Markers festzustellen (Abb.13b, c).

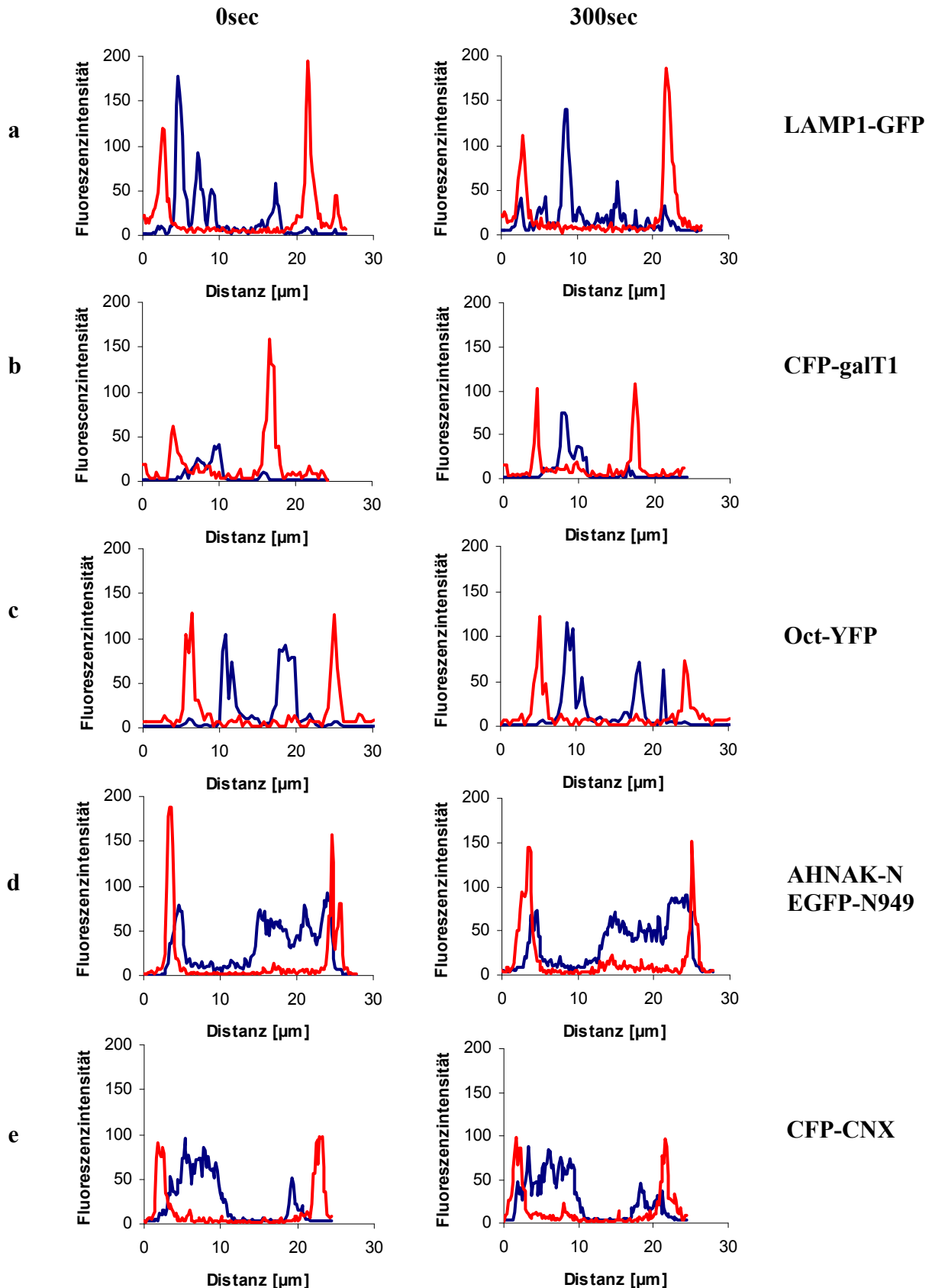


Abb.13 Translokation intrazellulärer Markermoleküle an die Zellmembran.

CHO-Zellen wurden durch Transfektionen mit den organellenspezifischen Markern LAMP-1-GFP (Lysosomen), CFP-galT1 (Golgi), OCT-YFP (Mitochondrien), AHNAK-EGFP-N949 (Enlargeosomen) und CFP-CNX (ER) (alle blau) sowie dem Zellmembranmarker FM4-64 (rot) angefärbt. Danach wurden sie für 300 Sek. mit SLO behandelt (200 U/ml). Vor und nach der SLO-Behandlung wurde die Translokation der Organellenmarker mittels horizontaler Schnitte durch den Äquator der Zellen in Fluoreszenzintensitätshistogrammen dargestellt.

In Abb.14 wurde die Überlagerung der Marker mit der Zellmembran mittels einer Zeitserie nachgewiesen. Auf die fluoreszenzmarkierte Plasmamembran wurden ROI gelegt und die Assoziation der durch fluoreszenzmarkierten Zellorganellen mit der SLO geschädigten Plasmamembran zeitabhängig analysiert. Hierbei zeigte sich wiederum keine Rekrutierung von Markern, die spezifisch für den Golgi-Apparat bzw. die Mitochondrien waren. Allerdings zeigte sich eine Steigerung der ER-Markerproteine in diesem Bereich. Dies deutet auf eine Beteiligung von ER-Membranen bei der Reparatur der SLO-geschädigten Plasmamembran hin.

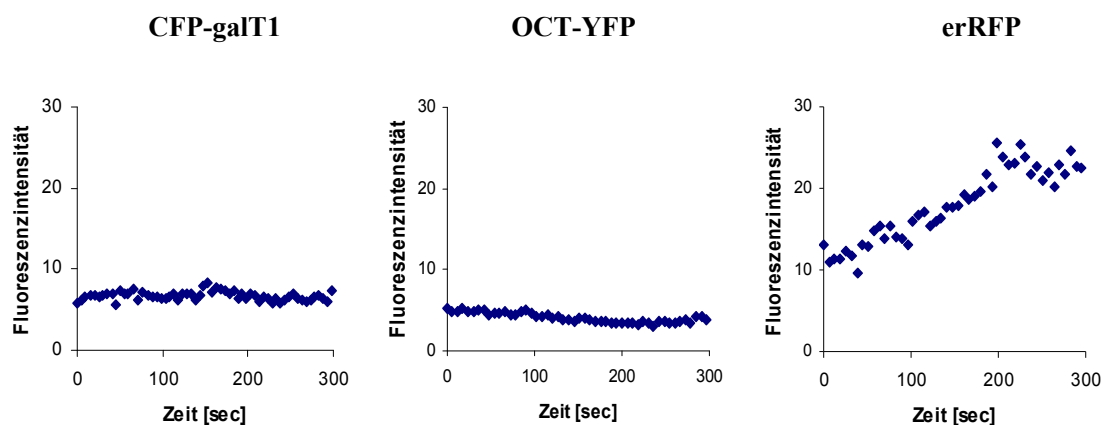


Abb.14 Zeitabhängigkeit der Rekrutierung von ER-Membranen an die Zellmembran.

CHO-Zellen wurden durch Transfektion mit CFP-galT1 (Golgi-Apparat), OCT-YFP (Mitochondrien) und erRFP (ER) für diese unterschiedlichen Organellen markiert und anschließend mit FM4-64 die Zellmembran angefärbt. In den Zellen wurden vor der SLO-Behandlung 5 ROIs im Bereich der FM4-64-Fluoreszenz definiert, die über die gesamte Zellzirkumferenz verteilt waren. In diesen Arealen wurde die organellenspezifische Fluoreszenz online registriert.

In Abb.14 ist die Zeitabhängigkeit der Translokation von ER-Membranen in die Zellmembran nach einer Schädigung mit SLO gezeigt. Dabei ergab sich, dass die Translokation bis 200 Sek. ansteigt und danach einen Sättigungswert erreicht.

III.1.1.3. Analyse der molekularen Mechanismen der Rekrutierung von ER-Membranen

Anhand der neugewonnenen Erkenntnisse, dass an der Wiederherstellung der Membranintegrität auch ER-Membranen beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob es sich dabei um neugebildete oder präformierte ER-Membranen handelt. An den sogenannten ER exit sites (ERES) entstehen ER-Vesikel, die innerhalb der sekretorischen Wege an den Cis Bereich des Golgi-Apparates andocken. Dieser Prozess wird dadurch eingeleitet, dass ein Coat der

Vesikel durch COPII (coating protein complex II) an den ERES entsteht, dessen Bildung durch die Aktivierung des Sar1-Protein gestartet wird. Wird Sar1 gehemmt, so kommt es demzufolge zu keinem korrekten Coating und keiner Fusion der ER-Vesikel mit dem Golgi Apparat. Um die Rolle der COPII positiven ER-Vesikel an der Verletzungsregenerierung zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für die Sar1-Mutante Sar1H79G kodiert. Dieses mutierte Sar1-Protein verhindert den Transport der ER-Vesikel über den sekretorischen Signalweg an die Plasmamembran (Hasdemir *et al.* 2005). Nach Transfektion mit Sar1H79G war die Resealing-Fähigkeit der Zellen deutlich eingeschränkt (Abb.15a).

Da durch Transfektion mit Sar1H79G der sekretorische Weg insgesamt unterbrochen wird, wurde als nächstes die Wirkung einer akuten Hemmung der ER-Vesikelbildung auf das Wiederverschließen der Zellmembran untersucht.

Dazu wurden CHO-Zellen in Anwesenheit eines mutierten Sar1-Proteins (Sar1[T39N]p) durch Glaskügelchen mechanisch geschädigt und wiederum auf ihre Resealing-Fähigkeit untersucht (Abb.15b).

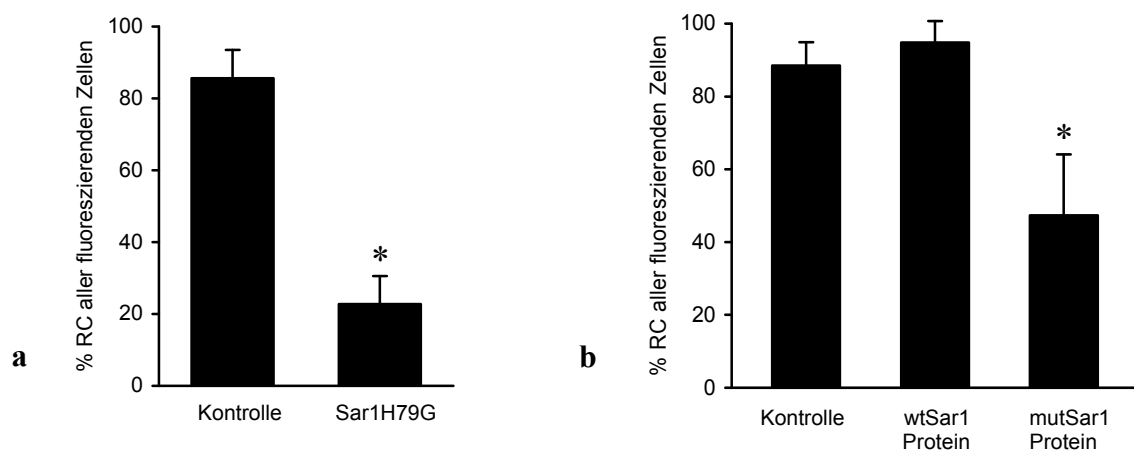


Abb.15 Bedeutung von Sar1 für die Resealing-Fähigkeit von geschädigten Zellen

a) CHO-Zellen wurden mit einem Sar1H79G transfiziert, woraufhin die Bildung der COPII-Vesikel gehemmt wird. Anschließend wurden sie nach Schädigung mit Glaskügelchen auf ihre Resealing-Fähigkeit mittels Dextranen untersucht. Mittelwerte \pm S.D. Analysen an > 300 Zellen in 3 Experimenten. * $p < 0.001$. Unabhängiger t-Test.

b) CHO-Zellen wurden in Anwesenheit von wtSar1p bzw. mutSar1[T39N]p-Proteinen (je 500nM) durch Glaskügelchen geschädigt und mittels Dextranen auf ihre Resealingfähigkeit untersucht. Mittelwerte \pm S.D. Analysen an > 500 Zellen in 4 Experimenten. * $p < 0.001$. One Way ANOVA for multiple comparisons.

Wie aus Abb.15b ersichtlich, behindert auch eine akute Unterbrechung der COPII-Bildung ein adäquates Wiederverschließen der Zellmembran und damit eine Membranreparatur. Ergebnisse anderer Autoren lassen vermuten, dass spezifische SNARE-Proteine des ER (u.a. Syntaxin18, STX18) mit komplementären Proteinen der Zellmembran interagieren können

(u.a. Syntaxin1-4 und SNAP-23), wodurch es zur Fusion von ER-Vesikeln mit der Zellmembran kommen kann (Hatsuzawa *et al.* 2006). Daher wurden in weiteren Experimenten CHO-Zellen mit STX18siRNA transfiziert, wodurch die Expression von STX18 reduziert wurde. Abb.16a zeigt, dass es nach Transfektion mit STX18siRNA es zu einer deutlich verschlechterten Membranreparatur kommt. Auch war in Anwesenheit von anti-STX18-AK das Wiederverschließen der Zellmembran tendenziell erschwert (Abb.16b).

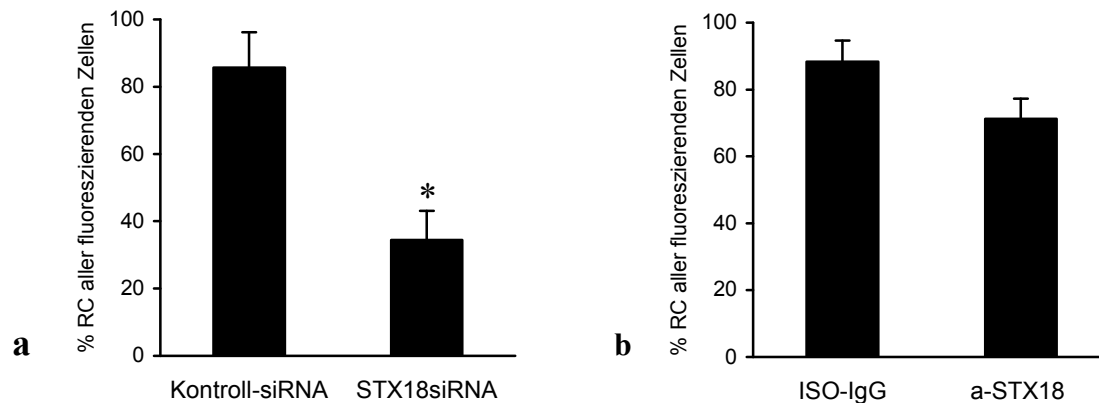


Abb.16 Bedeutung von STX18 für die Resealing-Fähigkeit von geschädigten Zellen

a) CHO-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA sowie mit STX18siRNA transfiziert. Ihre Resealing-Fähigkeit wurde nach einer Glaskügelchenschädigung mittels Dextranen untersucht.

Mittelwerte \pm S.D. Analysen an > 400 Zellen in 3 Experimenten. * $p < 0.001$. Unabhängiger t-Test.

b) CHO-Zellen wurden unter Vorhandensein von Isotyp-Antikörper sowie anti-STX18-Antikörper durch Glaskügelchen geschädigt und ihre Resealing-Fähigkeit mittels Dextranen untersucht. Mittelwerte \pm S.D. Analysen an > 500 Zellen in 4 Experimenten.

Eine stärkere Reduktion der Resealing-Fähigkeit der Zellen wurde nach STX18-Blockade in Fibroblasten beobachtet (Abb.17).

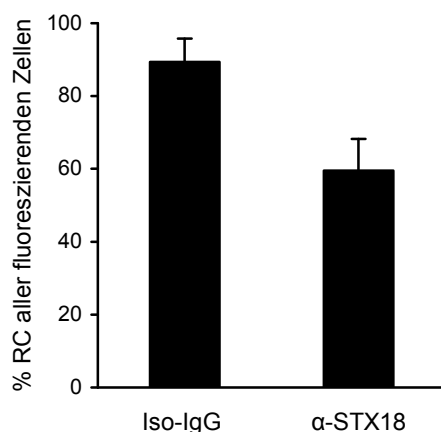


Abb.17 Bedeutung von STX18 für die Membranreparatur in geschädigten Fibroblasten

Fibroblasten wurden unter Vorhandensein von Isotyp-AK sowie anti-STX18-AK durch Glaskügelchen geschädigt und ihre Resealing-Fähigkeit mittels Dextranen untersucht. Mittelwerte \pm S.D. an > 300 Zellen in 2 Experimenten.

III.1.2. Nachweis von ER-Proteinen an Membranverletzungen *in vivo*

Um zu prüfen, ob es auch *in vivo* zur Exposition von ER-Proteinen an Verletzungsstellen kommt, wurde ein Tiermodell der Rückenmarkverletzung eingesetzt. Es wurden transgene *Thy1-YFP* Mäuse verwendet, welche ein gelb fluoreszierendes Protein spezifisch in den Axonen exprimieren. Mit diesem Modell lassen sich demnach Axone zweifelsfrei identifizieren. 20 Minuten nach Verletzung wurden in Assoziation mit wiederverschlossenen Zellen die ER-Proteine CNX (luminal Domäne) sowie ERp57 an der Verletzungsstelle mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert (Abb.18).

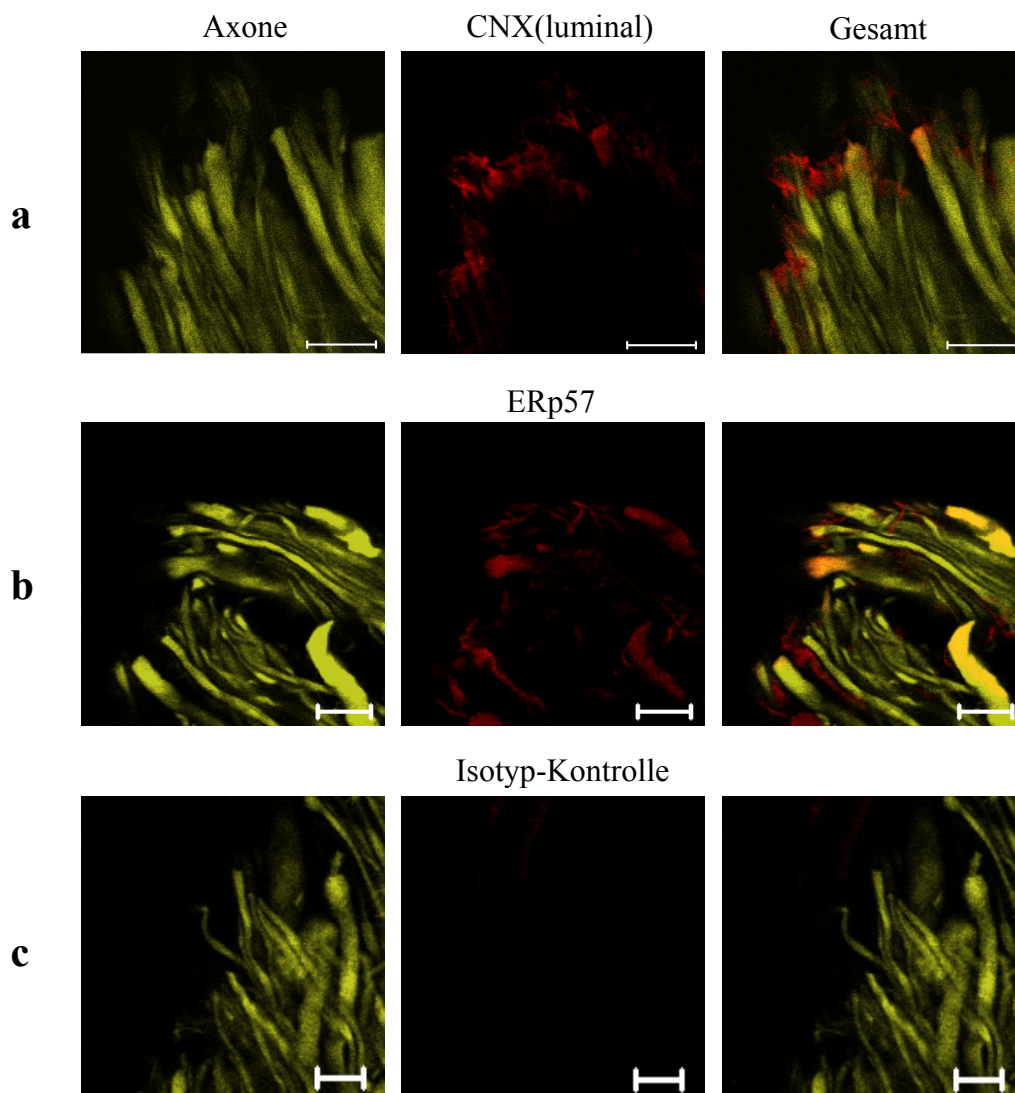


Abb.18 Nachweis von ER-Proteinen an Verletzungsstellen von Axonen *in vivo*

An transgenen *Thy1-YFP* Mäusen wurde eine axonale Transektion durchgeführt. Nach einer 20 minütigen Resealing-Phase wurde der Bereich explantiert und Cryoschnitte dieses Areal angefertigt. Anschließend wurden ER-Proteine mit spezifischen fluoreszenzmarkierten AK (rot) an den Axonenenden (gelb) nachgewiesen. Im mittleren Panel sind die detektierten Proteine dargestellt: **a)** CNX (luminal), **b)** ERp57 (PDI-Homolog), **c)** Isotyp-Kontrolle. Grössenindikator = 10µm.

III.2. MP

III.2.1. Aufnahme von MP in phagozytosekompetente Zellen

Nach Verletzungen, nach Aktivierung und bei mechanischem Stress sezernieren Zellen MP in das umliegende Milieu. Diese MP werden von der Plasmamembran gebildet und tragen die gleichen Oberflächenrezeptoren wie ihre Ursprungszelle. Die extrazelluläre Konzentration der MP wird offensichtlich genau reguliert. Dazu trägt neben der Bildung auch die Clearance der MP bei, über die noch wenig bekannt ist. Die MP-Clearance erfolgt möglicherweise über die Internalisierung in verschiedene Zellen. Um dies zu untersuchen, wurden MP mit Makrophagen und humanen Monozyten inkubiert. Wie in Abb.19 dargestellt, kam es dabei zu einer zeitabhängigen Zunahme der intrazellulär detektierbaren Mikropartikel über den gesamten untersuchten Zeitraum von 60 Minuten.

Zur Markierung der MP wurden CHO-Zellen zunächst mit einem fluoreszenzgekoppelten TF-CFP Plasmid transfiziert, woraufhin diese Zellen CFP-markierten TF, ein integrales Protein der Plasmamembran exprimieren. Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers mechanischem Stress ausgesetzt, um die MP-Freisetzung zu induzieren. Die dabei gebildeten MP enthielten in der Tat TF-CFP.

Durch die Fluoreszenzmarkierung der Monozytenzellmembran konnten die intrazellulären von den extrazellulären Mikropartikeln unterschieden werden. Da es sich bei TF um ein transmembranöses Protein handelt, welches die MP markiert, war es möglich zwischen einer Fusion und einer Internalisierung der MP zu unterscheiden. Im Falle einer Fusion der MP mit der Plasmamembran, müsste es zu einer Überlagerung der Fluoreszenzfärbung der MP mit derjenigen der Zellmembran kommen. Wie allerdings in Abb.19 zu erkennen, waren die MP fast ausschließlich innerhalb der Monozyten lokalisiert, was auf eine Internalisierung der MP hindeutet.

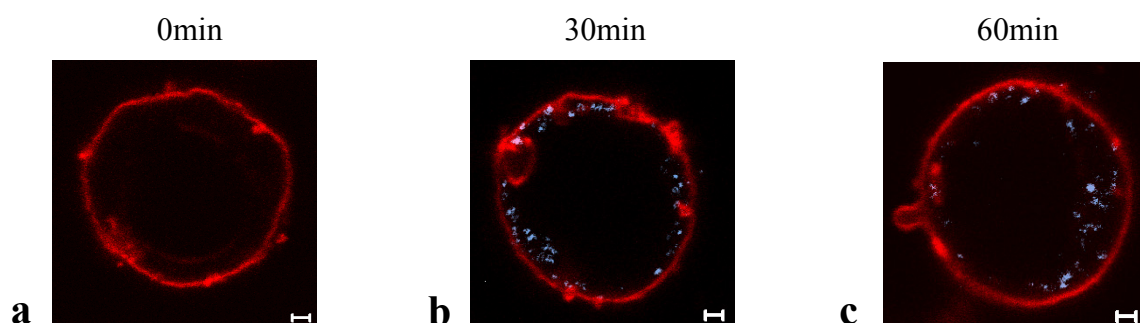


Abb.19 Zeitabhängige Aufnahme von TF-CFP positiven MP in humane Monozyten

Monozyten wurden mit dem Membranmarker Vybrant DiD (rot) markiert und über verschiedene Zeiträume (a 0 Min., b 30 Min., c 60 Min.) mit TF-CFP positiven Mikropartikeln (blau) in Resuspension inkubiert. Grössenindikator = 1 μ m

Für eine quantitative Auswertung des zeitlichen Verlaufs der MP-Aufnahme in Monozyten wurde die Zunahme der von den Mikropartikeln stammenden intrazellulären Fluoreszenz gemessen (Abb.20). In diesem Falle wurden zirkulierende humane MP mit DCF fluoreszenzmarkiert und wiederum mit membranmarkierten Monozyten über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die für dieses Experiment verwendeten zirkulierenden MP wurden unmittelbar zuvor aus humanem Plasma isoliert. Die zweite MP-Population wurde nach Stimulation von Thrombozyten aus dem Überstand der Thrombozytensuspension isoliert.

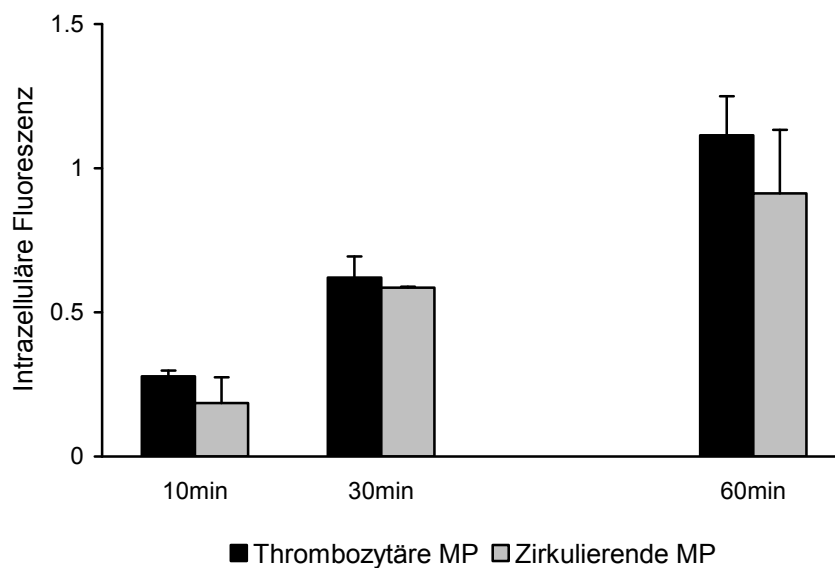


Abb.20 Quantitative Zunahme der intrazellulären MP-Fluoreszenz

Zellmembranmarkierte Monozyten wurden mit DCF gelabelten MP über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die MP-assoziierte intrazelluläre Fluoreszenz zeigt eine zeitabhängige Zunahme. Die Fluoreszenzveränderung innerhalb des Monozyten wurde mit einer ROI berechnet, die ROI wurde anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert. Dargestellt wird die durchschnittliche intrazelluläre Fluoreszenzsteigerung in 10 Bildern, pro Bild wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (n=3). Mittelwerte \pm S.D.

Da sich isolierte Monozyten aufgrund der nach 60 Min. beginnenden Apoptose nicht über einen längeren Zeitraum bei der MP-Aufnahme beobachten ließen, wurde für die 24 Std. Untersuchung eine monozytäre THP-1-Zelllinie verwendet, welche sich nach Stimulation mit PMA zu adhärenenten Makrophagen differenzieren lassen. Dabei ergab sich, dass bereits nach 60 Min. eine maximale MP-Aufnahme erreicht wird (Abb.21).

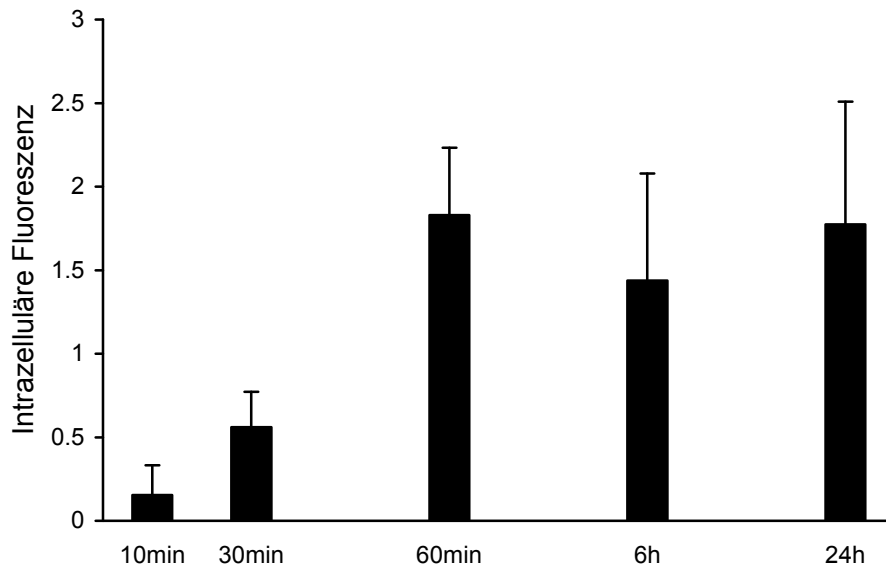


Abb.21 Aufnahme thrombozytärer MP in Makrophagen

THP1-Zellen wurden zu Makrophagen differenziert und anschließend mit thrombozytären MP über 24 Std. inkubiert. Die Zunahme der von den MP stammenden intrazellulären Fluoreszenz zeigt eine gesteigerte Aufnahme der MP. Die Fluoreszenzveränderung innerhalb der Makrophagen wurde mit einer ROI berechnet, die anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert wurden. Dargestellt wird die durchschnittliche intrazelluläre Fluoreszenzsteigerung in 10 Bildern, pro Bild wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (n=3).

III.2.2. Aufnahme von tumorzellgenerierten MP in phagozytosefähige Zellen

Wie eingangs erwähnt, wird den MP zunehmend mehr Bedeutung in der Genese von Tumoren-assoziierten Thrombosen zugesprochen. Auch wurde eine Zunahme von MP in Blut von Krebspatienten beobachtet. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Steigerung u.a. durch eine reduzierte Internalisierungseffizienz der aus Tumorzellen gebildeten MP bedingt ist.

Um dies zu untersuchen, wurden MP aus L3.6pl-Zellen präpariert, einer Pankreaskarzinomzelllinie, die *in vivo* hochmetastatisch wirksam ist.

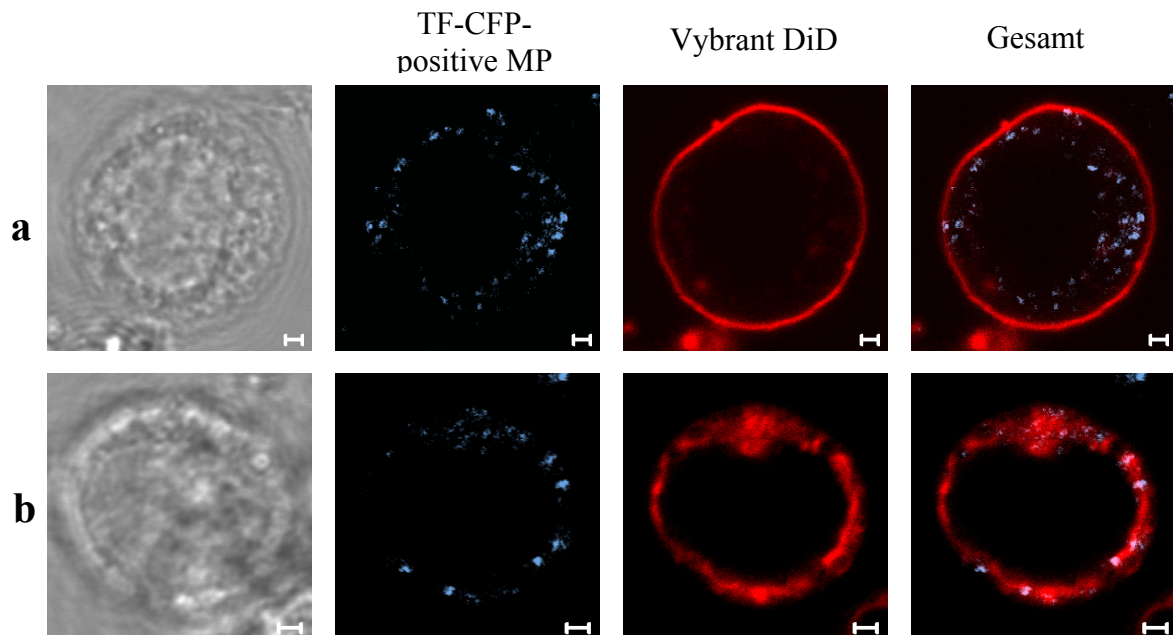


Abb.22 Unterschiedliche Aufnahme von MP aus Tumorzellen und normalen MP in Monozyten

Aus dem Überstand von TF-CFP transfizierten CHO- und L3.6pl-Zellen wurden MP isoliert.

Die TF-CFP-positiven MP (blau) generiert aus entweder transfizierten CHO-Zellen (**a**) oder L3.6pl Zellen (**b**) wurden mit Vybrant DiD -markierten Monozyten (rot) für 60 Min. inkubiert. Grössenindikator = 1 μ m

Wie bereits in Abb.19 dargestellt, waren die aus CHO-Zellen generierten TF-CFP-positiven MP nach 60 Min. mehrheitlich innerhalb der Monozyten nachweisbar (Abb.22a). Hingegen kam es bei den TF-CFP-positiven MP aus L3.6pl-Zellen mehrheitlich zu einer Überlagerung des Fluoreszenzsignals mit dem Zellmembranmarker (Abb.22b). Da es sich bei dem exprimierten TF-CFP-Protein um einen transmembranöses Protein handelt, weist dies auf eine direkte Assoziation/Fusion der MP mit der Plasmamembran der Zelle hin.

Wie aus Abb.23 zu ersehen (identisch zum Versuchsaufbau von Abb.20 und 21), bestätigten die quantitativen Analysen das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der tumorzellgenerierten MP im Verhältnis zu den normalen MP. In den Experimenten wurde auch eine zweite Pankreaskarzenomzelllinie (FG) verwendet, die *in vivo* Primärtumore induziert, aber keine Metastasen induziert. Es liessen sich deutliche Unterschiede in dem Ausmass der MP-Aufnahme in die Monozyten während eines Inkubationszeitraumes von 60 Min. erkennen.

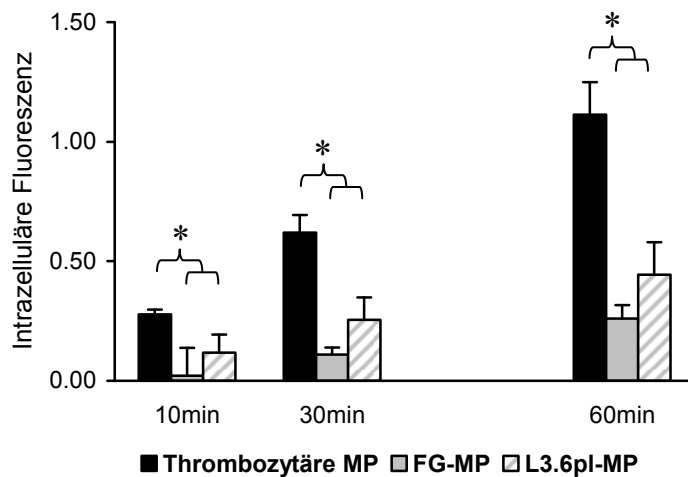


Abb.23 Quantitative Auswertung der Aufnahme von tumorzellgenerierten MP in Monozyten

MP wurden aus dem Überstand von zwei Pankreaskarzinonmzelllinien (L3.6pl und FG) isoliert. Die DCF-markierten MP wurden mit membranmarkierten humanen Monozyten über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten mit thrombozytären MP inkubiert. Die Zunahme der von den MP stammenden Fluoreszenz innerhalb der Monozyten wurde mit einer ROI berechnet, die ROI wurde anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert. Ausgewertet wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von insgesamt 10 Bildern, pro Bild wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (n=3). Mittelwerte \pm S.D. *p < 0.001. One Way ANOVA for multiple comparisons

Ebenso deutliche Unterschiede in der Aufnahmeeffizienz wurden nach Inkubation der verschiedenen MP-Populationen mit Makrophagen beobachtet (Abb.24).

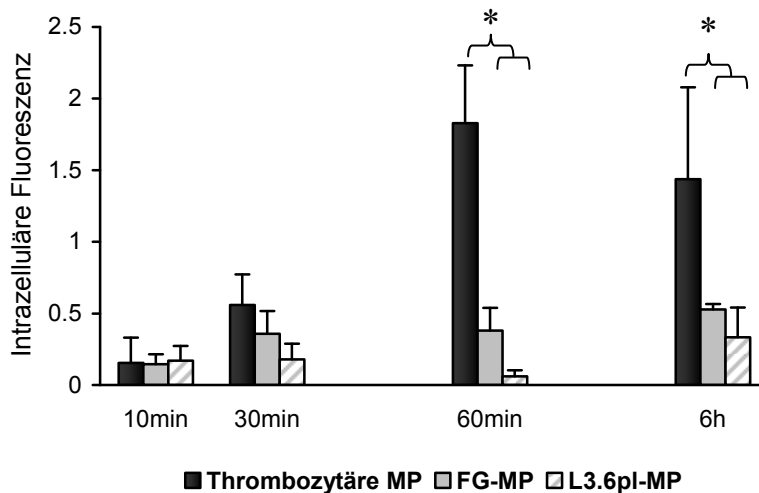


Abb.24 Quantitative Auswertung der Aufnahme von tumorzellgenerierten MP in Makrophagen

MP wurden aus dem Überstand von zwei Pankreaskarzinonmzelllinien (L3.6pl und FG) isoliert. Die DCF-markierten MP wurden mit membranmarkierten THP1-Makrophagen über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Als Kontrolle wurden die Makrophagen mit thrombozytären MP inkubiert. Die Zunahme der von den MP stammenden Fluoreszenz innerhalb der Makrophagen wurde mit einer ROI berechnet, die ROI wurde anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert. Ausgewertet wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von insgesamt 10 Bildern, pro Bild wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (n=3). Mittelwerte \pm S.D. *p < 0.001. One Way ANOVA for multiple comparisons.

III.2.3. Untersuchung der an der Aufnahme von MP beteiligten Membranrezeptoren

Die beobachtete Aufnahme der Mikropartikel in monozytäre Zellen lässt auf eine Beteiligung von rezeptorvermittelten Mechanismen bei dieser Endozytose schließen. Einen möglichen Kandidaten stellen Scavenger Rezeptoren in der Membran von Monozyten dar.

Diese Rezeptoren vermitteln u.a. die Aufnahme von Makromolekülen mit negativer Oberflächenladung in Zellen. Da der Klasse B Scavenger Rezeptor CD36 MP binden kann (Ghosh *et. al* 2008), wurde die Beteiligung von CD36 an der MP-Aufnahme untersucht.

Monozytäre Zellen wurden mit verschiedenen MP-Populationen, in Anwesenheit eines spezifischen anti-CD36-Antikörpers inkubiert.

Wie in Abb. 25 dargestellt kam es nach Blockade von CD36 zu einer deutlichen Reduzierung der MP-Aufnahme in Makrophagen.

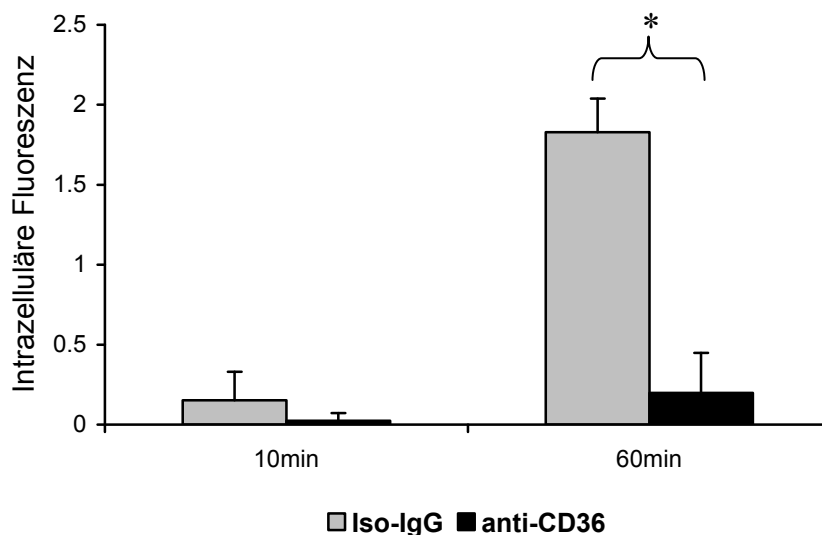


Abb.25 Quantitative Auswertung des Einflusses einer CD36-Rezeptor-Blockade auf die MP-Internalisierung in Makrophagen

THP1-Makrophagen wurden mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper oder einem anti-CD36-Antikörper 15 Min. vorinkubiert, anschließend folgte eine Inkubation mit thrombozytären DCF-markierten MP. Die Zunahme der von den MP stammenden Fluoreszenz innerhalb der Makrophagen wurde mit einer ROI berechnet, die ROI wurde anhand des Plasmamembranmarkers Vybrant DiD definiert. Ausgewertet wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von insgesamt 10 Bildern, pro Bild wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet (n=3). Mittelwerte \pm S.D. *p < 0.001. One Way ANOVA for multiple comparisons.

III.2.4. *In vivo* Analyse der MP-Aufnahme

Nach der Analyse der an der zellulären MP-Aufnahme beteiligten Mechanismen stellte sich die Frage, welche Organe die Clearance der zirkulierenden MP *in vivo* vermitteln. An einem Mausmodell wurde die Retention markierter MP in verschiedenen Organen untersucht. Dazu infundierte man den Versuchstieren $^{111}\text{Indium}$ -markierte murine MP. Nach einem Zeitraum von 20 Min. wurden die Organe auf den Verbleib dieser MP mittels eines Gamma Counters analysiert (Abb.26). Die Ergebnisse zeigten, dass hauptsächlich die Leber, daneben auch Milz, Niere und Lunge an der Clearance der applizierten MP aus dem Blutkreislauf beteiligt sind.

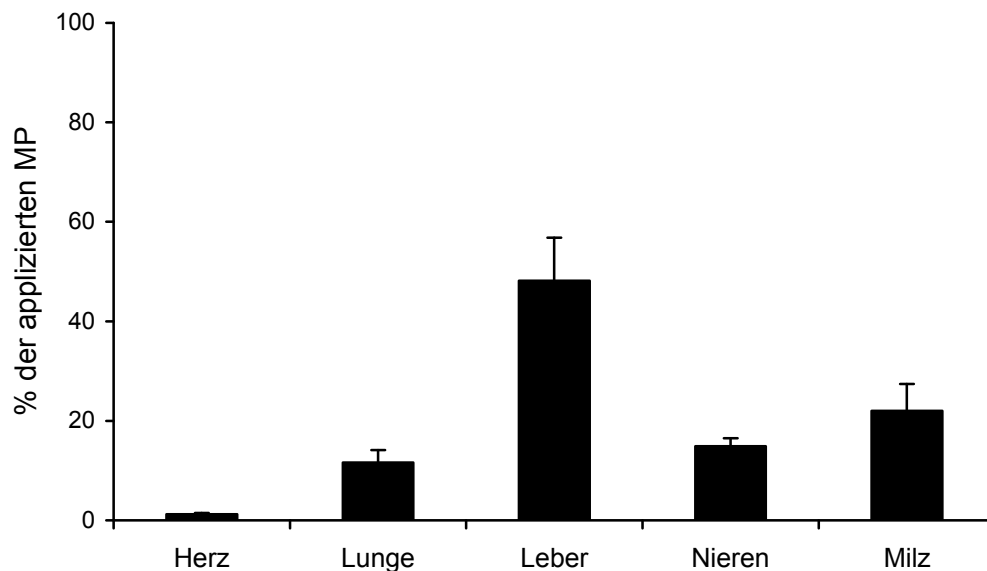


Abb.26 Verteilung radioaktiv-markierter MP in verschiedenen Organen

Den Versuchstieren wurden $25\mu\text{g}$ $^{111}\text{Indium}$ -markierte murine zirkulierende MP über einen in der A.carotis liegenden Katheter appliziert. Nach 20 Min. Inkubation wurde $^{111}\text{Indium}$ in den Organen mittels Gamma Counter gemessen. $n=6$, Mittelwerte \pm S.E.M.

III.2.5. Vergleich der MP-Verteilung in den Organen von wt und CD36^{-/-}-Mäusen

Da die *in vitro*-Daten auf eine Beteiligung des Scavenger Rezeptors CD36 an der Internalisierung von MP in Zellen hinweisen, wurde als Nächstes untersucht, ob CD36 unter *in vivo*-Bedingungen die Clearance der MP beeinflusst. Hierzu wurden CD36-defiziente Mäuse untersucht. In Abb.27 ist die Verteilung der radioaktiv-markierten MP in den Organen CD36-defizienter Tiere bezogen auf die Verteilung in wt Mäusen dargestellt.

Es zeigte sich grundsätzlich eine Reduzierung der MP-Aufnahme in allen Organen im Vergleich zu den wt Tieren, speziell in Milz und Niere. Andererseits konnte eine Zunahme der detektierbaren MP im Plasma der CD36-defizienten Tiere verglichen mit wt Tieren beobachtet werden.

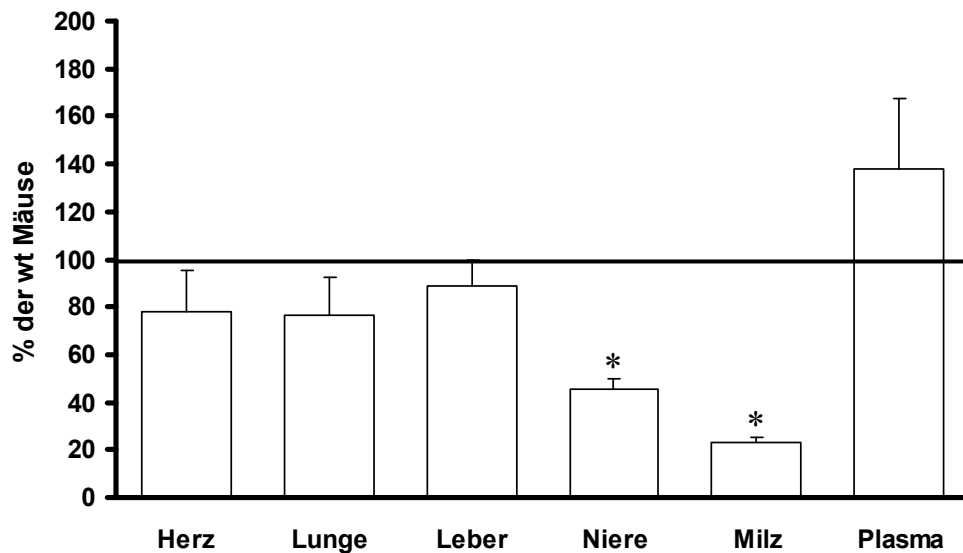


Abb.27 Quantitative Verteilung radioaktiv-markierter MP in verschiedenen Organen von CD36^{-/-} Mäusen

Den CD36-defizienten Mäusen bzw. wt Mäusen wurden 25 μ g ¹¹¹Indium-markierte murine zirkulierende MP über einen in der A.carotis liegenden Katheter appliziert. Nach 20 Min. Inkubation wurde ¹¹¹Indium in den Organen mittels Gamma Counter gemessen. Die Angaben beziehen sich auf die entsprechenden Werte in wt Tieren (als 100% gesetzt). n=6, Mittelwerte \pm S.E.M. * p<0.001. One Way ANOVA for multiple comparisons.

IV. Diskussion

IV.1. Membrane Resealing

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit den Mechanismen, welche Zellen in die Lage versetzen die Integrität ihrer Zellmembran nach Verletzung wiederherzustellen. Dazu wurden die an der Membranreparatur beteiligten intrazellulären Vesikel und deren intrazelluläre Ausgangskompartimente untersucht. Sind Zellen beispielsweise mechanischem oder chemischem Stress ausgesetzt, so führt dies zum Verlust der Integrität der Zellmembran und zum Austreten von Bestandteilen des Cytoplasmas. Sind Zellen nicht in der Lage die Ruptur der Zellmembran zu verschließen, kommt es zum nekrotischen Zelltod. Aufgrund eines offensichtlich evolutionär verankerten Prozesses sind Zellen allerdings grundsätzlich befähigt, limitierte Schädigungen zu reparieren.

Durch eine aktive, Ca^{++} -abhängige Vesikelexozytose werden auch relativ große Membranrupturen ($\sim 10\mu\text{m}$) durch die Ausbildung einer Vesikelbarriere an dieser Stelle wiederverschlossen (McNeil & Kirchhausen 2005). Da dieser Prozess unmittelbar eingeleitet werden muss, ist die Zelle gezwungen auf verschiedene Reservoirs an Membranen zurückzugreifen.

Das rasch ablaufende Resealing konnte bereits an Membranen verschiedener kernhaltiger Zellpopulationen nachgewiesen werden (Reddy *et al.* 2001). Ca^{++} ist aufgrund der in der Membran notwendigerweise stattfindenden Fusionprozesse bei diesem Prozess von entscheidender Bedeutung. Auch bei den hier dargestellten Experimenten führte der Entzug von Ca^{++} zu einer signifikanten Reduktion der Membranreparaturprozesse (Abb.5).

IV.1.1. Ursprungskompartimente der an der Zellmembranreparatur beteiligten Vesikel

Bei den bisherigen Untersuchungen wurde den Lysosomen eine zentrale Rolle bei der Zellmembranreparatur eingeräumt (Andrews 2002). Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass Ca^{++} -sensitive Oberflächenproteine der Lysosome wie Synaptotagmin und das Vorhandensein von Fusionsproteinen (TI-VAMP) an der Bildung eines solchen Vesikelpatches beteiligt sind (Martinez *et al.* 2000).

Allerdings stellen auch andere Zellorganellen potentielle Kandidaten zur Bereitstellung von Vesikeln für die Membranreparatur dar. In der Literatur wurde dem ER bislang keine weitere

Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit der Membranreparatur geschenkt, obwohl es die prozentual größte Membranoberfläche innerhalb der Zelle darstellt. Innerhalb des sekretorischen Weges werden kontinuierlich Vesikel aus dem ER freigesetzt. Diese COPII-Vesikel gelangen zunächst über den sekretorischen Transportweg zum Golgi Apparat und von dort an die Zellmembran, wo es zur Exozytose des Vesikelinhaltes kommt.

IV.1.2. Exozytose intrazellulärer Vesikel

Die hier dargestellten Experimente wurden vorrangig mittels konfokaler Laserscanmikroskopie durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, zwischen der Lokalisation der untersuchten Proteine auf der Zelloberfläche bzw. intrazellulär zu unterscheiden, da sie ausschließlich die Fluoreszenzereignisse einer einzelnen Ebene innerhalb des 3-dimensionalen Zellkörpers detektiert. Die Untersuchungen zur Oberflächenexposition verschiedener Proteine an der Membranschädigungsstelle mittels Antikörper wurden an einem mechanischen Verletzungsmodell durchgeführt. Durch den Kontakt der adhärenen Zellen mit Glaskügelchen wurde selektiv eine mechanische Schädigung der Zellmembran hervorgerufen. Zur grundsätzlichen Analyse des Resealing-Verhaltens der Zellen wurden fluoreszierende Dextrane verwendet. Durch das schnelle Eindiffundieren des ersten Dextranderivats in die Zellen während der Schädigung, und die Exklusion eines zweiten Dextranderivats nach einer erfolgten Membranreparatur, ist man in der Lage zwischen RC und Non-RC zu unterscheiden (Miyake *et al.* 2003). Das Rupturareal und die dort akkumulierten Vesikel können durch die Exklusion des Dextran-1 an dieser Stelle identifiziert werden, da sich das Dextran im Cytoplasma befindet und nicht innerhalb der neu generierten Vesikel (Abb.6 und Abb.7).

In einem ersten Schritt wurden die luminalen ER-Proteine PDI sowie GRP94 an den Rupturarealen nachgewiesen (Abb.6b und Abb.7b). Aus bisherigen Untersuchungen mittels TIRF-Mikroskopie ist bekannt, dass es bei derartigen Reparaturmechanismen der Zellmembran zur Translokation von Vesikeln in den Membranbereich und deren anschließender Fusion mit der Phospholipiddoppelschicht der Plasmamembran kommt (Kap. I.1.1.2).

Eine derartige Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran führt zu einer Umkehr der Domänen-Lokalisation transmembranöser Proteine. Nach einer Fusion konnten interne luminal Domänen der Vesikel auf der Oberfläche der Membran gefunden werden (Schmoranzner *et al.* 2000).

In einem weiteren Schritt wurde sodann die Fusion von ER Vesikeln mit der Plasmamembran anhand eines transmembranösen Proteins nachgewiesen. Im Falle des ER-Membranproteins CNX wurde analysiert, ob die luminalen /oder die cytoplasmatische Domäne des Proteins an der Zelloberfläche detektierbar ist. Wie aus Abb.8 zu ersehen, kam es zu einer verstärkten Exposition der luminalen im Vergleich zur cytoplasmatischen Domäne von CNX an den Rupturarealen der Zellmembran von CHO-Zellen. Auch in Fibroblasten wurde die luminalen Domäne von CNX nach einer mechanischen Schädigung durch Glaskügelchen und erfolgreicher Membranregenerierung an der Reparaturstelle detektiert (Abb.9).

Da die Exposition von luminalen Domänen lysosomaler Proteine Ca^{++} -abhängig ist, wurde auch im Falle des CNX der Einfluss von Ca^{++} untersucht. Untersuchungen an Dictyostelium konnten bereits die Ca^{++} -Abhängigkeit der Exposition der ER Proteine CNX und Calretikulin während der Phagozytose nachweisen (Müller-Taubenberger *et al.* 2001). In Anwesenheit von Ca^{++} wurden bei 80% der RC die luminalen CNX-Domäne an der Rupturstelle detektiert. Entzog man den Zellen hingegen Ca^{++} , sanken diese Werte auf ca. 20% ab (Abb.10). Es konnte somit auch für die Beteiligung der ER-Vesikel am Membrane Resealing eine Ca^{++} -Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den ER-Proteinen wurde an den Rupturstellen auch die luminalen Domäne des organellenspezifischen Markerproteins von Lysosomen nachgewiesen (Abb.11b) (Rodríguez *et al.* 1997). Auch konnte eine Beteiligung der Enlargeosomen an der Membranreparatur durch einen luminal bindenden AK des spezifischen Markerprotein Desmokinin/AHNAK bestätigt werden (Abb.11e) (Cocucci *et al.* 2004).

Darüber hinaus kam es auch nach Schädigung der Zelle durch SLO zu einer Translokation der spezifischen Marker von Lysosomen, Enlargeosomen und ER an die Plasmamembran. Jedoch wurde keine Translokation der Golgi-spezifischen bzw. mitochondrialen Marker beobachtet (Abb.13). Die hier vorgestellten Daten zeigen eine deutlich schnellere Translokation von ER Vesikeln an die SLO-geschädigte Zellmembran als es bei Untersuchungen zur Exozytose lysosomaler Vesikel der Fall war (Idone *et al.* 2008). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ER-Vesikel in der Tat an der Zellmembranreparatur nach verschiedenen Schädigungen beteiligt sind.

IV.1.3. Transportmechanismen der Vesikel in die Plasmamembran

Das Andocken und die Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Plasmamembran ist ein SNARE vermittelter Prozess. Zu Beginn des sekretorischen Weges binden spezifische COPII-Proteine

an die ER-Vesikel, um deren Transport von den ERES über das ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) zum Cis-Golgi-Netzwerk (Appenzeller-Herzog & Hauri 2006) zu ermöglichen. Um den Transportweg der ER Vesikel zu analysieren, wurde das Resealing-Verhalten der Zellen nach einer Blockade dieses Transportweges analysiert. Durch Transfektion der CHO-Zellen mit einem mutierten Sar1-Plasmid (Sar1H79G) wurde das Coating der ER-generierten Vesikel durch COPII unterbunden und es fand somit kein Transport über das ERGIC zum Golgi Apparat statt (Hasdemir *et al.* 2005). Hierdurch kam es zu einer signifikanten Reduktion der positiven Resealing-Ereignisse (Abb.15a). Ein ähnlicher Effekt wurde erreicht, indem den Zellen während der mechanischen Schädigung ein mutiertes Sar1-Protein zugeführt wurde. Bei Zellen, denen während der Schädigung intaktes Sar1-Protein zugefügt wurde, konnte sogar eine leicht gesteigerte Resealing-Quote gegenüber den Kontrollen beobachtet werden (Abb.15b).

Die Sar1-Mutation führte somit zur Hemmung des Weitertransports der ER-sezernierten Vesikel über den Golgi Apparat und dadurch zur Verhinderung der Exozytose.

Ein weiteres an der ER-Vesikel Exozytose beteiligtes Fusionsprotein stellt STX18 dar. Es ist insbesondere im ER lokalisiert und in die frühe Phase des sekretorischen Transportwegs zwischen ER und Golgi eingebunden (Hatsuzawa *et al.* 2000). Durch die Blockade von STX18 kann die Exozytose der ER-Vesikel über den sekretorischen Transportweg zu einem sehr frühen Zeitpunkt unterbunden werden. Nach Herabregulierung der STX18 Synthese durch spezifische siRNA wurde eine signifikante Reduktion der Resealing-Ereignisse beobachtet (Abb.16a). Ein ähnlicher Effekt wurde durch die Blockade des Proteins mittels der Zugabe eines spezifischen Antikörpers erreicht (Abb.16b und Abb.17).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Sar1 und STX18 die durch ER-Vesikel vermittelte Membranreparatur unterstützen.

IV.1.4. Nachweis von ER-Vesikeln an Verletzungsstellen *in vivo*

Nachdem eindeutige Hinweise auf die Beteiligung von ER-Vesikeln an der Regeneration von Membranrupturarealen *in vitro* vorlagen, wurde deren mögliche Bedeutung an Verletzungsstellen *in vivo* analysiert. Die physiologische Relevanz der Membranreparatur im Allgemeinen kommt vor allem bei Zellpopulationen zum Tragen, welche aufgrund ihrer Lokalisation nicht in der Lage sind Tochterzellen zu bilden. Dies ist vor allem bei Muskelzellen und neuronalen Zellen der Fall. Zur Untersuchung der Resealing-Fähigkeit dieser Zellen wurde ein Verletzungsmodell des Zentralen Nervensystems gewählt. Nach der

Durchtrennung des Rückenmarks wurde das Membrane Resealing der Axone untersucht. In dem verwendeten Mausmodell wird im Cytoplasma ein fluoreszenzmarkiertes Protein exprimiert, welches beim nicht erfolgten Wiederverschluss nach einer Membranruptur aus dem Axon diffundiert. Daher kann bei Retention des Proteins im Cytoplasma von einer erfolgreichen Regeneration ausgegangen werden. Nach einer 20 minütigen Regenerationsphase wurden die Verletzungsenden der Axone detailliert untersucht. Dabei wurden verschiedene ER Proteine wie CNX und ERp57 an der Verletzungsstelle der Axone nachgewiesen (Abb.18a und b). Die durchtrennten Axone entwickeln am Verletzungsende sogenannte Bulbs, was auf eine erfolgte Axon Transektion hinweist (Misgeld & Kerschensteiner 2006). An den Bulbs konnten ebenfalls nach 20 Min. ER-Proteine nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob den ER-Vesikeln neben ihrer Aufgabe als Membrandonator weitere Funktionen zukommen. Die Regeneration von Zellen durch Verschluss der Membran könnte eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr spielen, da sie die Zelle vor einer Invasion durch Krankheitserreger schützen könnte. Der Membranverschluss und die damit verbundene Exposition spezifischer Proteine könnte demnach eine Strategie der Zellen darstellen, um einer Pathogeninvasion entgegen zu wirken und den Zellverband auf diese Weise temporär zu schützen, bis die geschädigte Zelle durch Makrophagen systemisch entfernt wird. Beispielsweise ist bekannt, dass das ER-Protein GRP94 Listerien bindet (Cabanes *et. al* 2005).

Die Bedeutung von ER-Vesikeln bei Resealing-Mechanismen, zeigt sich auch am Beispiel von Muskelzellen, welche einer stetigen mechanischen Beanspruchung unterliegen. Diese Zellen müssen ständig ihre Zellmembran reparieren, da sie kontinuierlich hohen Scherraten ausgesetzt sind. Unlängst wurde ein muskelspezifisches TRIM Protein (tripartite motif family protein) MG53 (Mitsugumin53) detektiert, das an der Muskelreparatur beteiligt ist (Cai *et al.* 2009). Es liegt in intakten Zellen als Monomer vor und besitzt eine Sensitivität für oxidative Veränderungen innerhalb des Zellmilieus. Nach Ruptur der Zellmembran findet eine Oligomerisation der Monomere über Disulfidbrückenbindungen statt. MG53 interagiert mit PS-Molekülen auf intrazellulären Vesikeln sowie mit denen an der rupturierten Plasmamembran. Die Untersuchung von Cai *et al.* postuliert, dass der Vesikeltransport an die Rupturstelle und die Ca^{++} -abhängige Vesikelfusion voneinander unabhängige Mechanismen sind. Erst findet ein primärer Verschluss der Membran statt, anschließend bewirkt der lokal auftretende Ca^{++} -Influx eine Fusion der translozierten Vesikel mit der Plasmamembran. Bringt man diese Erkenntnis mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zusammen, so

könnten die schnell sezernierten PDI-haltigen ER-Vesikel für die Oxidation der freien Cysteine von MG53 Monomeren und die dadurch vermittelten Disulfid Doppelbindungen verantwortlich sein.

IV.2. Freisetzung von MP: potentielle Bedeutung für die Eliminierung von Eat-Me-Signalen

Zellen setzen unter verschiedenen Bedingungen, wie mechanischem oder chemischem Stress, bei Apoptose, sowie verschiedenen pathologischen Erkrankungen Membranvesikel frei. Hierdurch kann es zu erhöhten systemischen MP-Konzentrationen im Blut kommen. Eine charakteristische Eigenheit der MP ist ihre Oberflächenkonstellation, welche derjenigen der aktivierten/geschädigten Ursprungszelle ähnelt.

Grundsätzlich sind Zellen durch die Externalisierung spezifischer Moleküle an der Oberfläche in der Lage den umliegenden Immunzellen zu signalisieren, ob sie nach Schädigung oder aufgrund des Zellalters systemisch entfernt werden müssen oder nicht.

Im Falle einer irreversiblen Zellschädigung signalisiert die Zelle ihrer Umgebung durch sogenannte Eat-Me-Signale, dass sie irreversibel geschädigt wurde und aus dem System zur Vermeidung überschießender Immunreaktion entfernt werden muss (Nagata *et al.* 2010).

Im Rahmen der Untersuchungen zum Resealing-Prozess von Zellmembranen konnte gezeigt werden, dass Zellen aufwendige Abläufe in Bewegung setzen, um ihre Membranintegrität wiederherzustellen. Allerdings könnte der Membranreparaturprozess dadurch beeinträchtigt werden, dass es beim Resealing zu einer Exposition von PS auf der Zelloberfläche kommt, was zur Clearance der frisch reparierten Zellen durch Phagozytose-kompetente Zellen führen würde. Um dem zu entgehen, könnten wiederverschlossene Zellen PS-haltige MP sezernieren (Boulanger *et al.* 2006).

Damit wäre die Zelle in der Lage sich dieser Eat-Me-Signale zu entledigen und ihren Status zu erhalten. Die Freisetzung von PS-positiven MP nach reversibler Zellschädigung könnte auch aus energetischen Gründen sinnvoll sein. Im Gegensatz zu den aktiven ATP-abhängigen Prozessen zur Internalisierung von PS, wie z.B. durch die Aminophospholipid-Translokase stellt die Sezernierung von PS-positiven MP in der Tat einen energieeffizienteren Weg dar.

IV.2.1. Clearance thrombozytärer MP über Phagozytosemechanismen

Aufgrund der prothrombogenen Eigenschaften der MP ist deren systemische Clearance von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Hämostase-Balance. Es stellte sich daher die Frage, auf welchem Weg MP von Phagozytose-kompetenten Zellen internalisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen normale MP mit Hilfe eines Phagozytosemechanismus aufnehmen (Abb.19 und Abb.22a).

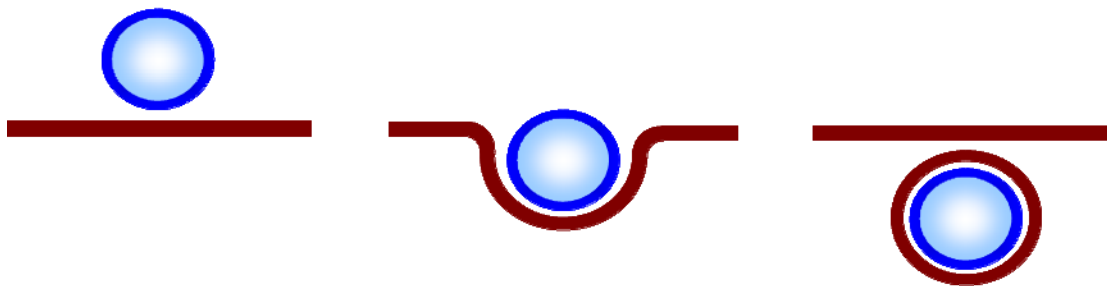


Abb.28 MP Internalisierung über Phagozytosemechanismen

IV.2.2. Clearance karzinomatöser MP durch Fusionsprozesse

Im Gegensatz zur Aufnahme normaler MP wurden MP aus Karzinomzellen kaum in Makrophagen internalisiert. Hingegen kam es zu einer Fusion mit der Plasmamembran. Das wird durch andere Studien bestätigt, die ebenfalls eine Fusion von MP aus Karzinomzellen mit der Plasmamembran normaler Zellen zeigen (Kalinkovich *et al.* 2006, Al-Nedawi *et al.* 2008) (Abb.22b).

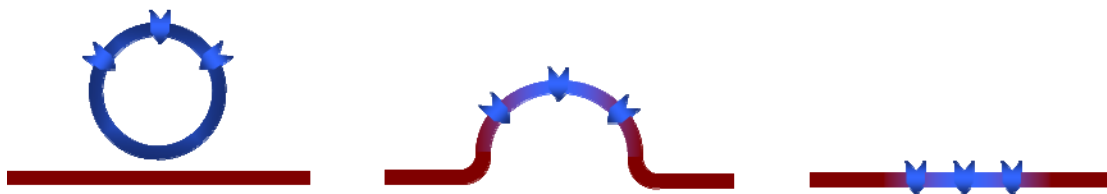


Abb.29 Fusion karzinomatöser MP mit Makrophagen

IV.2.3. MP Clearance als Rezeptorvermittelter Mechanismus

Es ist bekannt das MP aus lipidreichen Mikrodomänen (rafts) der Zellmembran entstehen können (Del Conde *et al.* 2005, Hugel *et al.* 2005). Rafts enthalten u.a. Cholesterin, Glycolipide und Sphingolipide. Im humanen System wird das Lipoprotein gebundene Cholesterin über Scavenger Rezeptoren auf der Akzeptorzelloberfläche internalisiert. Eine Beteiligung diese Rezeptorfamilie bei der MP-Internalisierung scheint daher vorstellbar. Als ein möglicher Kandidat wurde CD36 ausgewählt, da CD36 MP binden kann und außerdem mit PS interagiert (Pittoni & Valesini 2002, Ghosh *et al.* 2008), das auf vielen MP exponiert wird. Auf Makrophagen bildet CD36 einen Scavenger Rezeptor CD36/alphaV/beta3-Komplex und ist in deren Phagozytoseprozesse involviert.

Die Internalisierung thrombozytärer MP in Makrophagen war nach Blockade des CD36-Rezeptors mittels AK signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert (Abb.25). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Abhängigkeit der MP Clearance von CD36 *in vivo* anhand eines CD36-defizienten Mausmodell untersucht.

IV.2.4. MP Clearance *in vivo*

Die Verteilung der radioaktivmarkierten MP in den verschiedenen Organen wurde mit einem Gamma Counter nach Injektion der MP in die Blutzirkulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei wt Mäusen die Clearance der MP hauptsächlich über die Leber erfolgt, gefolgt von Milz, Niere und Lunge (Abb.26). Zur Untersuchung der Rezeptorabhängigkeit der Internalisierung wurden markierte MP auch in CD36-defiziente Mäusen infundiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die MP Aufnahme in allen Organen tendenziell vermindert, wobei eine signifikante Reduktion in Milz und Niere beobachtet wurde (Abb.27). Die verminderte Clearance in den einzelnen Organen wurde auch durch den Anstieg der MP im Blut CD36-defizienter Mäuse bestätigt. Im Vergleich zu den *in vitro* Daten war die Reduktion allerdings weniger deutlich ausgeprägt. Die Blockade des CD36 Rezeptors auf zellulärer Ebene durch AK stellt eine unmittelbare Intervention dar. Hingegen fehlt bei defizienten Tieren der Rezeptor seit dem Embryonalstadium. Es ist daher davon auszugehen, dass in dem letzteren Fall kompensatorische Mechanismen zum Tragen kommen, z.B. dadurch, dass andere Clearance-Rezeptoren die Funktion von CD36 übernehmen.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass CD36 an der Internalisierung von MP *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist, und dass noch weitere, bislang unbekannte Rezeptoren zusätzlich die MP-Clearance vermitteln müssen.

V. Zusammenfassung

Unter *in vivo* Bedingungen kann es in Zellen, die shear stress ausgesetzt sind (wie z.B. Endothel und Epithelzellen) ständig zu Rupturen der Plasmamembran kommen. Das sogenannte Membrane Resealing stellt die Fähigkeit von Zellen dar, auf eine solche Schädigung zu reagieren und die Membranintegrität durch schnelle Fusionsprozesse intrazellulärer Vesikel an Verletzungsstellen wiederherzustellen. Vielfach belegt ist hierbei die Beteiligung lysosomaler Vesikel sowie Enlargeosomen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Beteiligung ER-generierter Vesikel an diesen Reparaturprozessen der Zellmembran nachgewiesen werden. In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde eine Translokation von ER-Membranen an die geschädigten Areale der Zellmembran gezeigt. Eine Fusion der ER-Membranen mit der Zellmembran wurde durch den Nachweis luminaler Domänen transmembranöser ER-Proteine (CNX) sowie luminaler (löslicher) ER-Proteine (ERp57) an den Verletzungsstellen von Axonen des Rückenmarkes *in vivo* bestätigt. Durch die Blockade der am ERES freigesetzten COPII-Vesikel (Sar1) wurde der frühe sekretorische Transportweg vom ER zum Cis-Golgi-Netzwerk unterbunden. Damit einhergehend kam es zu einem verminderten Resealing der geschädigten Areale in der Zellmembran. Die Ergebnisse zeigen, dass die schnelle Freisetzung von ER-Vesikeln nach mechanischer Verletzung bzw. Schädigung der Plasmamembran durch bakterielle Toxine entscheidend an der Reparatur und Regenerierung geschädigter Zellen beteiligt ist.

Nach mechanischer Schädigung kommt es auch zur Freisetzung von exozytotischen Vesikeln, sogenannten Mikropartikeln (MP), in den extrazellulären Raum. Bisher ist weitgehend unbekannt, wie die Homöostase der externalisierten MP koordiniert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen gezeigt, dass die extrazelluläre Konzentration der MP über die Clearance mittels verschiedener Endozytose-/Phagozytoseprozesse reguliert wird. An der Internalisierung dieser Vesikel ist der Class B Scavenger-Rezeptor CD36 beteiligt. Eine Blockade dieses Rezeptors *in vitro* zeigte eine deutliche Reduktion der Aufnahme von MP in phagozytosefähige Zellen. *In vivo* konnte eine CD36-abhängige Reduktion der MP-Aufnahme in verschiedenen Organen (vor allem Niere, Milz) in CD36-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden unter *in vitro*-Bedingungen Unterschiede bei der Internalisierung normaler und karzinomatöser MP nachgewiesen. Im Gegensatz zur zellulären Aufnahme von MP aus nicht-transformierten Zellen, wurden MP aus karzinomatösen Zellen nicht über

Endozytose/Phagozytose internalisiert. Hingegen kam es hierbei zu einer Fusion von karzinomatösen MP mit der Membran der Akzeptorzelle, einem Mechanismus, der an der Transformation normaler Zellen in karzinomatöse Zellen beteiligt sein könnte. Insgesamt gesehen wurde hierdurch gezeigt, dass MP über Endozytose/Phagozytose in Zellen internalisiert werden, und dass dies organspezifisch über den Scavenger Rezeptor CD36 vermittelt wird.

VI. Summary

Rupture of plasma membrane occurs under *in vivo* conditions in cells exposed to high shear stress such as endothelial and epithelial cells. This can be counteracted by the ability of cells to repair their cell membrane via fast fusion of intracellular vesicles with the plasma membrane at the site of injury. The participation of lysosomal vesicles and enlargeosomes in this process is widely documented. In the present work it was shown for the first time that ER-generated vesicles participate in the repair mechanism at the plasma membrane.

As documented by several experimental assays ER proteins rapidly translocate to damaged areas of the cell membrane. Fusion of the ER vesicles with the plasma membrane was shown by detection of luminal domains of transmembranous ER proteins (CNX). Also luminal (soluble) ER proteins (ERp57) were identified at the injury site both *in vivo* and *in vitro* in the spinal cord. By blocking the release of COPII vesicles at the ERES via Sar1-mutants, the early secretory pathway from the ER to the cis-Golgi-network was inhibited. Consequently, resealing of the injured areas of the cell membrane was impaired. The results show that the fast release of ER vesicles after mechanical injury or bacterial toxin-induced injury is essential for the repair and regeneration of injured cells.

Mechanical injury also leads to the release of exocytotic vesicles into the extracellular compartment, so-called microparticles (MP). So far regulation of the homeostasis of MP is largely unknown. In the present work we could show that under *in vitro* and *in vivo* conditions the extracellular MP concentration is regulated by their clearance via different processes of endocytosis/phagocytosis. The class B scavenger-receptor CD36 was shown to contribute to the cellular internalisation of MP. Blocking this receptor *in vitro* led to a considerable reduction of MP uptake into phagocytotic cells. A reduction of MP uptake into various organs (especially kidney and spleen) could be shown *in vivo* in CD36-deficient animals. Furthermore, a difference in internalization of normal and cancer MP could be shown. In contrast to the cellular uptake of MP derived from non-transformed cells, MP from cancer cells are not internalized via endocytosis/phagocytosis. Instead, a fusion of the cancer MP with the membrane of the acceptor cells takes place. This mechanism could be involved in the transformation of normal cells into cancer cells. Altogether it could be shown that MP are internalized into cells via endocytosis/phagocytosis and that the scavenger receptor CD36 is involved in an organ-specific manner.

VII. Literatur

Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A (2003). Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* **1**, 2434-43

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10**, 619-24

Appenzeller-Herzog C & Hauri HP (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of Cell Science* **119**, 2173-83

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**, 1303-16

Andrews NW (2002). Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol* **158**, 389-94

Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423**, 168-72

Beaudoin AR, Grondin G (1991). Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta* **1071**, 203-19

Bement WM, Yu HY, Burkel BM, Vaughan EM, Clark AG (2007). Rehabilitation and the single cell. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 95-100

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack A, Sturk A (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* **85**, 639-46

Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 317-30

Bi GQ, Alderton JM, Steinhardt RA (1995). Calcium regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J Cell Biol* **131**, 1747-58

Bi GQ, Morris RL, Liao G, Alderton JM, Scholey JM, Steinhardt RA (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *J Cell Biol* **138**, 999-1008

Borgonovo B, Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Bachi A, Meldolesi J (2002). Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. *Nat Cell Biol* **4**, 955-62

Boulangier CM, Amabile N, Tedgui A (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* **48**, 180-86

Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999). In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* **1**, 50-62

Busson-Mabillot S (1984). Endosomes transfer Yolk proteins to lysosomes in vitellogenic oocyte of the trout. *Biol Cell* **51**, 53-66

Cabanes D, Sousa S, Cebriá A, Lecuit M, García-del Portillo F, Cossart P (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J* **24**, 2827-38

Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, Ko JK, Lin P, Thornton A, Zhao X, Pan Z, Komazaki S, Brotto M, Takeshima H, Ma J (2009). MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* **1**, 56-64

Chaineau M, Danglot L, Galli T (2009). Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett* **583**, 3817-26

Chambers R & Chambers EL (1961). Explorations into the nature of the living cell.

Harvard Univ. Press

Chernomordik LV, Kozlov MM (2003). Proteinlipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**, 175-207

Clarke MS, Caldwell RW, Chiao H, Miyake K, McNeil PL (1995). Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ Res* **76**, 927-34

Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Rupnik M, Meldolesi J (2004). Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route. *Mol Biol Cell* **15**, 5356-68

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604-11

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R (2004). Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* **34**, 392-401

Farkas O, Povlishock JT (2007). Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Prog Brain Res* **161**, 43-59

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15781-86

Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Li X, Ni Y (2010). Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* **208**, 264-69

Furie B, Furie BC (2006). Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 177-81

George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA (1982). Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* **60**, 834-40

Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, Silverstein RL (2008). Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J Clin Invest* **118**, 1934-43

Glover L, Brown RH Jr. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic* **8**, 785-94

Hasdemir B, Fitzgerald DJ, Prior IA, Tepikin AV, Burgoyne RD (2005). Traffic of Kv4 K⁺ channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway. *J Cell Biol* **171**, 459-69

Hatsuzawa K, Hirose H, Tani K, Yamamoto A, Scheller RH, Tagaya M (2000). Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J Biol Chem* **275**, 13713-20

Hatsuzawa K, Tamura T, Hashimoto H, Hashimoto H, Yokoya S, Miura M, Nagaya H, Wada I (2006). Involvement of syntaxin 18, an endoplasmic reticulum (ER)-localized SNARE protein, in ER-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* **17**, 3964-77

Heijnen HGF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood* **94**, 3791-99

Heilbrunn LV (1958). The dynamics of living protoplasm. *New York: Academic*, 634

Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A (2007). Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemos* **97**, 119-23

Huang Y, Laval SH, van Remoortere A, Baudier J, Benaud C, Anderson LV, Straub V, Deelder A, Frants RR, den Dunnen JT, Bushby K, van der Maarel SM (2007).

AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J* **21**, 732-42

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM (2005). Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology (Bethesda)* **20**, 22-27.

Idone V, Tam C, Andrews NW (2008). Two-way traffic on the road to plasma membrane repair. *Trends Cell Biol* **18**, 552-59

Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM (2002). Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in non-secretory cells. *J Cell Biol* **159**, 625-35

Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M, Ratajczak MZ (2006). Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* **46**, 1199-209

Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE (2001). Microparticles from patients with multi-organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* **85**, 810-20

Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A, Kahn J, Brill A, Petit I, Goichberg P, Tesio M, Netzer N, Naparstek E, Hardan I, Nagler A, Resnick I, Tsimanis A, Lapidot T (2006). Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* **66**, 11013-20

Kanazawa S, Nomura S, Kuwana M, Muramatsu M, Yamaguchi K, Fukuhara S (2003). Monocyte-derived microparticles may be a sign of vascular complication in patients with lung cancer. *Lung Cancer* **39**, 145-49

Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S (2003). Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* **39**, 184-191

Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Belanger CM (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* **49**, 772-77

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75

Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachý J, Stangassinger M, Erfle V, Schlöndorff D (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000 **6**, 769-75

Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV (2006). Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* **107**, 4746-53

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **101**, 841-43

Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, Andrews NW (2000). Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol* **148**, 1141-49

McNeil PL & Baker MM (2001). Cell surface events during resealing visualized by scanning-electron microscopy. *Cell Tissue Res* **304**, 141-46

McNeil PL & Khakee R (1992). Disruptions of muscle fiber plasma membranes: Role in exercise-induced damage. *Am J Pathol* **140**, 1097-109

McNeil PL & Kirchhausen T (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **6**, 499-505

McNeil A & McNeil PL (2005). Yolk granule tethering: a role in cell resealing and identification of several protein components. *J Cell Sci* **118**, 4701-8

McNeil PL, Miyake K, Vogel SS (2003). The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4592-97

McNeil PL & Steinhardt R (2003). Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **3**, 697-731

McNeil PL & Terasaki M (2001). Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane. *Nat Cell Biol* **3**, 124-29

Misgeld T & Kerschensteiner M (2006). In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 449-63

Miyake K, McNeil PL (2003). Mechanical injury and repair of cells. *Crit Care Med* **31**, 496-501

Mueller I, Klocke A, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* **17**, 476-78

Müller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, Ecke M, Simmeth E, Gerisch G (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J* **20**, 6772-82

Nagata S, Hanayama R, Kawane K (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619-30

- Ninomiya Y, Kishimoto T, Miyashita Y, Kasai H (1996). Ca^{2+} -dependent exocytotic pathways in Chinese hamster ovary fibroblasts revealed by a caged- Ca^{2+} compound. *J Biol Chem* **271**, 17751-54
- Pasteels JJ (1966). Multivesicular bodies of the egg of *Barnea candida* (bivalve mollusca) studied with the electron microscope. Acid phosphatase activity and the accumulation of neutral red. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 301-10
- Pelham HR (2001). SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol* **11**, 99-101
- Pittoni V & Valesini G (2002). The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* **1**, 154-61
- Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstmann LL, Valle M, Aime G, Ahn YS (2003). Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* **41**, 211-17
- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem* **279**, 20471-79
- Reddy A, Caler EV, Andrews NW (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157-69
- Reininger A J, Heijnen H F G, Schumann H, Specht H, Schramm W, Ruggeri Z M (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* **107**, 3537-45
- Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW (1999). cAMP regulates Ca^{2+} -dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem* **274**, 16754-59

Rodríguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997). Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* **137**, 93-104

Schmoranzner J, Goulian M, Axelrod D, Simon SM (2000). Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **149**, 23-32

Schulte B, Linke D, Klumpp S, Schaller M, Riess T, Autenrieth IB, Kempf VA (2006). Bartonella quintana variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. *Infect Immun* **74**, 5003-13

Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP (2003). Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **102**, 2678-83

Simak J, Gelderman MP (2006). Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* **20**, 1-26

Sims PJ & Wiedmer T (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* **86**, 266-75

Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* **263**, 390-93

Sudhof TC (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neuroscience* **27**, 509-47

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* **71**, 1117-30

Tesselaar MET, Osanto S (2007). Risk of venous thromboembolism in lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* **13**, 362-67

Togo T, Alderton JM, Bi G-Q, Steinhardt RA (1999). The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J Cell Sci* **112**, 719-31

Tucker WC, Chapman ER (2002). Role of synaptotagmin in Ca²⁺ triggered exocytosis. *Biochem J* **366**, 1-13

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **59**, 277-87

Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, Gattinoni L, Thijs L, Webb A, Meier-Hellmann A, Nollet G, Peres-Bota D; ABC (Anemia and Blood Transfusion in Critical Care) Investigators (2002). Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA* **288**, 1499-507

Vince RV, Christmas B, Midgley AW, McNaughton LR, Madden LA (2009). Hypoxia mediated release of endothelial microparticles and increased association of S100A12 with circulating neutrophils. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 2-6

Wilson EB (1924). The cell in development and heredity. *New York: Macmillan*

Wolf P (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**, 269-88

Wu Y, Tibrewal N, Birge RB (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* **16**, 189-97

Zwaal RF and Schroit AJ (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-32

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt und gefördert haben. Mein besonderer Dank gilt:

Allen voran Prof. Dr. Bernd Engelmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die intensive Betreuung und umfassende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit in den letzten Jahren,

Prof. Dr. Dr. h.c. Seidel und Prof. Dr. Vogeser für die Möglichkeit, die Experimente am Institut für Klinische Chemie durchführen zu können,

Prof. Dr. Martin Kerschensteiner für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei den SCI-Experimenten, sowie Dr. Franz-Josef Gildehaus für die Unterstützung bei der Durchführung der Radioaktiv-Untersuchungen,

den Mitgliedern der AG Kupatt, insbesondere Rabea, Melanie, Tillmann und Jan für die herzliche und freundliche Unterstützung bei den *in vivo* Untersuchungen,

allen Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Verena, Lenka, Katja, Davit und Avinash für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre,

Pia und Prof. Peter Lohse, sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für die unermüdliche Bereitschaft bei Fragen immer helfend zur Seite zu stehen,

mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und vor allem meinem Lebensgefährten Marco, die mich immer unterstützt haben und mir den Zuspruch und die Kraft gaben, diese Arbeit zu vollenden.