
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Charakterisierung der molekularen Mechanismen
des Transfers von Mikropartikeln
und dessen Einfluss auf Akzeptorzellen**

Barbara Maria Köppler

aus

Heilbronn

2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. M. Mack betreut und von Herrn Prof. Dr. M. Biel vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17. Oktober 2005

(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am	20. Oktober 2005
1. Gutachter	Herr Prof. M. Mack
2. Gutachter	Herr Prof. M. Biel
Mündliche Prüfung am	01. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Zelluläre Mikropartikel	1
1.1.1 Charakterisierung von Mikropartikeln	1
1.1.2 Mechanismen der Mikropartikel-Bildung	3
1.1.2.1 Mikropartikel-Freisetzung unter physiologischen Bedingungen	5
1.1.2.2 Apoptotische Membranvesikel	5
1.1.3 Zusammensetzung der Membrankomponenten von Mikropartikeln	6
1.1.4 Funktionelle Eigenschaften der Mikropartikel	7
1.1.4.1 Transfer bioaktiver Moleküle	7
1.1.4.2 Mikropartikel und Entzündungen	8
1.1.4.3 Immunregulatorische Eigenschaften apoptotischer Membranvesikel	9
1.2 Internalisierung und Membranfusion	10
1.2.1 Endo- und Exozytose	10
1.2.2 Phagozytose	11
1.2.3 Membranfusion durch SNARE-Proteine	12
1.2.4 Annexin-vermittelte Membranfusion	13
1.2.5 Membranfusion durch Tetraspanine	14
1.3 Das Komplementsystem	15
1.3.1 Der klassische Aktivierungsweg	17
1.3.2 Der alternative Aktivierungsweg	17
1.3.3 Der Lektin Aktivierungsweg	18
1.3.4 Das Komplementprotein C3	18
1.3.5 Komplementrezeptoren	18
1.4 Mikropartikel und das Komplementsystem	20
1.4.1 Opsonierung von Mikropartikeln	20

1.4.2	Opsonierung apoptotischer Zellen.....	21
1.4.3	Immunregulatorische Eigenschaften von opsonierten Zellen	22
1.5	Das Immunsystem	23
1.5.1	Die Rolle der Lymphozyten im Immunsystem	23
1.5.1.1	B-Lymphozyten	23
1.5.1.2	T-Lymphozyten.....	24
1.5.2	Monozyten.....	25
1.5.3	Cytokine –Steuerfaktoren des Kommunikationssystems.....	26
1.5.3.1	Interleukin-10.....	26
1.5.3.2	Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α).....	27
1.5.3.3	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF).....	27
2	Zielsetzung der Arbeit	29
3	Material	31
3.1	Chemikalien und Reagenzien	31
3.1.1	Allgemeine Materialien	31
3.1.2	Komplement-Reagenzien	33
3.1.3	ELISA-Reagenzien	33
3.2	Lösungen und Puffer.....	33
3.3	Antikörper	34
3.4	Eukaryontische Zelllinien	36
3.5	Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen	36
3.6	Geräte	37
3.7	Verbrauchsmaterial	37
4	Methoden.....	39
4.1	Zellkultur	39
4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	39
4.1.2	Passagieren von Zellen	39
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl vitaler Zellen.....	40
4.2	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC).....	40

4.3	Durchflußzytometrie.....	41
4.3.1	Allgemeines.....	41
4.3.2	Fluoreszenzfärbung.....	44
4.3.2.1	Direktfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern	44
4.3.2.2	Direktfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	45
4.3.2.3	Sekundärfärbung.....	45
4.3.2.4	Erythrozytenlyse.....	45
4.4	Transfer von Mikropartikeln	46
4.4.1	Bildung von Mikropartikeln	46
4.4.2	Transfer-Experimente.....	46
4.5	Gewinnung spezifischer Zellen durch immunomagnetische Separierung	47
4.5.1	Positiv-Selektion: Isolation von CD14 ⁺ - und CD19 ⁺ -Zellen.....	47
4.5.2	Negativ-Selektion: Isolation von B-Zellen und T-Zellen.....	48
4.6	Bestimmung von Cytokin-Konzentrationen durch ELISA	49
4.7	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	49
4.7.1	Färbung der Donorzellen mit CM-Dil.....	49
4.7.2	Fixierung und Einbettung	50
4.7.3	Fluoreszenz-Mikroskopie	50
4.8	Statistische Auswertung.....	50
5	Ergebnisse	53
5.1	Charakterisierung der Mikropartikel.....	53
5.2	Transfer von isolierten Mikropartikeln auf Akzeptorzellen.....	55
5.2.1	Transfer von Dil markierten Mikropartikeln.....	55
5.2.2	Transfer in Abhängigkeit von Inkubationstemperatur und -zeit	58
5.2.3	Transfer von Mikropartikeln von Kato-Zellen.....	59
5.2.4	Transfer von PBMC auf PBMC	61
5.2.5	Transfer von PBMCs auf Endothelzellen.....	63
5.2.6	Floureszenz-mikroskopische Aufnahmen des Transfers von Mikropartikeln.....	64
5.3	Beeinflussung des Mikropartikel-Transfers.....	65
5.3.1	Phagozytose-Rezeptoren und <i>membrane-blebbing</i>	65

5.3.1.1	Einfluss von Phagozytose-Rezeptoren.....	65
5.3.1.2	Einfluss des ROCK-I-Inhibitors Y-27632	66
5.3.2	Einfluss von Cytochalasin auf den Transfer	67
5.3.3	Einfluss von Annexin V auf den Transfer.....	69
5.3.4	Ca ²⁺ -abhängiger Mikropartikel-Transfer	73
5.3.4.1	Einfluss von Ca ²⁺ und EDTA	74
5.3.4.2	Einfluss von Lanthan und Zink	76
5.3.5	Einfluss von Heparin auf den Transfer	78
5.3.6	Bedeutung der Thiol-Gruppen beim Transfer	80
5.3.6.1	Einfluss von N-ethylmaleimid auf den Transfer	81
5.3.6.2	Einfluss von Quecksilberchlorid.....	84
5.3.7	Bedeutung von SNARE-Molekülen beim Transfer von Mikropartikeln	85
5.3.7.1	Einfluss von Tetanus und Botulinum Neurotoxin	85
5.3.8	Bedeutung der Tetraspanine beim Mikropartikel-Transfer.....	86
5.4	Serum und Komplement	89
5.4.1	Transfer von Mikropartikeln auf Vollblut	89
5.4.2	Einfluss von Serum auf den Transfer von Mikropartikeln	90
5.4.3	Transfer mit verschiedenen Serum-Konzentrationen	92
5.4.4	Transfer mit verschiedenen Serum-Fraktionen	93
5.4.5	Transfer mit Hitze-inaktiviertem Serum	94
5.4.6	Transfer mit komplement-depletiertem Serum	97
5.4.7	Transfer mit iC3b.....	100
5.4.8	Transfer mit Komplement-Rezeptor-Antikörpern	101
5.5	Funktionelle Assays	105
5.5.1	Einfluss des Transfers auf die Cytokinproduktion.....	105
5.5.2	Einfluss des Transfers auf die B-Zell-Aktivierung	106
6	Diskussion.....	109
6.1	Charakterisierung der Mikropartikel	109
6.2	Charakterisierung des Transfers von Mikropartikeln.....	110
6.3	Calcium und Annexin V vermitteln den Vesikel-Transfer	112

6.3.1	Bedeutung der Thiol-Gruppen und des Zytoskeletts beim Transfer	114
6.3.2	Transfer von Mikropartikeln wird nicht durch Phagozytose vermittelt.....	115
6.3.3	Bedeutung der SNARE-Proteine beim Mikropartikel-Transfer ...	115
6.3.4	Bedeutung der Tetraspanine beim Mikropartikel-Transfer	116
6.4	Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten inhibiert pro- inflammatorische Cytokinproduktion	116
6.5	Komplementkomponenten vermitteln den Transfer von Mikropartikeln auf B-Zellen	117
6.6	Opsonierte Mikropartikel reduzieren die B-Zell-Aktivierung	120
6.7	Schlußfolgerung	121
7	Zusammenfassung	122
8	Literaturverzeichnis	125
9	Anhang	139

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
CCR	C-C-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CHO	chinese hamster ovary
CR	Komplementrezeptor
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HLA	human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
mAb	monoklonale Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MP	Mikropartikel
MV	Membranvesikel
NEM	N-ethylmaleimid
NSF	N-ethylmaleimid-sensitive factor
PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Saline

PMA	phorbol-12-myristate 13-acetat
PS	Phosphatidylserin
SNAP	synaptosome associated protein
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Unit (enzymatische Einheit)
VAMP	vesicle associated membrane protein
vs	versus, gegen

1 Einleitung

Mehrzellige Organismen müssen die Aktivität ihrer verschiedenen Organe und Zellen koordinieren und deren Funktionen aufeinander abstimmen. Für eine sinnvolle Kooperation und interzelluläre Kommunikation stehen höheren Organismen dazu vor allem Systeme wie das Nerven- und Blut-Kreislaufsystem zur Verfügung. Kommunikation nutzt nicht nur verschiedene Kanäle (optisch, akustisch, elektrisch, stofflich), sondern spielt sich auch auf unterschiedlichen Organisationsebenen ab. So ist der Informationsaustausch unter lebenden Einheiten die Basis der Systeme.

Die Bedeutung der Zellkommunikation kommt schon in der Ontogenese während der Induktion von Entwicklungsvorgängen zum Ausdruck. Aber auch im entwickelten Organismus spielt der Signalaustausch zwischen Zellen, etwa an der Synapse im Nervensystem oder zwischen Zellen des Immunsystems, eine wesentliche Rolle. Als Informationsüberträger dienen diffusible Stoffe im interzellulären Raum (z. B. Hormone, Cytokine, Chemokine oder Neurotransmitter im synaptischen Spalt), zellgebundene Oberflächenmoleküle (z. B. bei der Kontaktinhibition von Fibroblasten), hochmolekulare Stoffe in Basallamellen von Epithelien (z. B. bei der Organbildung) und lösliche Rezeptoren. Auch über „gap-junctions“ von elektrisch gekoppelten Zellen findet ein direkter Informationsaustausch statt. Das Freisetzen von extrazellulären Membranen von der Zelloberfläche in Form von Mikropartikeln und die Übertragung dieser Vesikel zwischen verschiedenen Zellen wurde erst kürzlich entdeckt und stellt ebenfalls einen möglichen Weg dar, wie Zellen miteinander kommunizieren. Die molekularen Mechanismen, wie Mikropartikel auf verschiedene Zellen übertragen werden, und die funktionelle Bedeutung des Mikropartikel-Transfers, werden in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

1.1 Zelluläre Mikropartikel

1.1.1 Charakterisierung von Mikropartikeln

Mikropartikel wurden 1967 zum ersten Mal in humanem Plasma als Membranfragmente, die von Thrombozyten freigesetzt werden, beschrieben (Wolf, 1967). Die Freisetzung findet nach Aktivierung mittels Thrombin, Kollagen oder mechanischem Stress statt (George et al., 1982). Diese kleinen Membranvesikel zeigen im Vergleich zu Thrombozyten eine prokoagulierende

Aktivität und können weitere Blutplättchen oder Endothelzellen aktivieren (Barry et al., 1997). Diese Aktivierung findet zum Teil dadurch statt, dass die in den Mikropartikeln enthaltene Arachidonsäure auf andere Zellen übertragen wird. Endothelzellen werden durch Thrombozytenpartikel zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 angeregt, was zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten führt (Barry et al., 1998). Letztlich zeigt sich, dass jede Zelle in jedem Differenzierungsstadium Stimulationen ausgesetzt sein kann, die zur Freisetzung von kleinsten Fragmenten von der Plasmamembran führen kann. Diese Fragmente werden als Mikropartikel oder Membranvesikel bezeichnet.

Mikropartikel sind kleine Membranvesikel, die von einer Vielzahl verschiedener Zellen freigesetzt werden und sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Elemente der Ursprungszelle tragen. Die Freisetzung von Membranvesikeln kann nach Aktivierung der Ursprungszelle, durch Eintreten der Apoptose (Barry et al., 1997; Mallat et al., 1999), aber auch unter physiologischen Bedingungen erfolgen (Beaudoin and Grondin, 1991).

In den letzten Jahren stieg das Interesse an der Funktionsweise solcher Mikropartikel nicht nur durch ihre prokoagulatorische Eigenschaft, sondern auch durch ihre putative Rolle in inflammatorischen Prozessen und ihrer Fähigkeit, zelluläre Funktionen direkt zu beeinflussen (Abbildung 1.1).

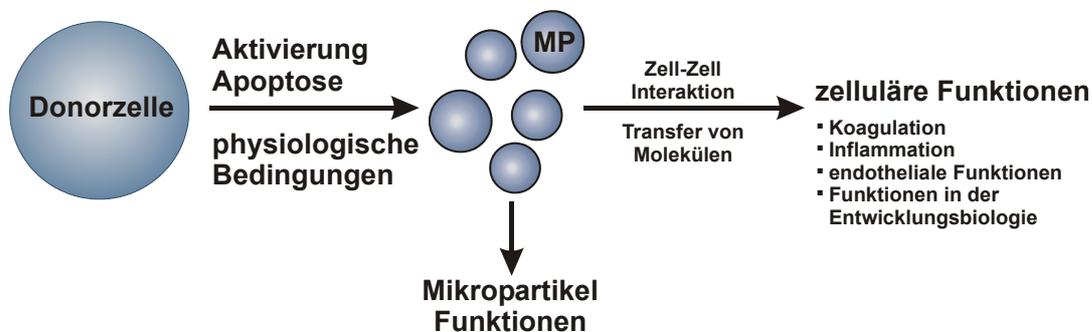


Abbildung 1.1: Bildung und funktionelle Eigenschaft von zellulären Mikropartikeln (MP) (modifiziert nach Diamant et al., 2004).

Die Mehrheit der im Blut vorkommenden Mikropartikeln entstammen Thrombozyten (George et al., 1982). Dahingegen treten Membranvesikel von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen in geringeren Mengen *in vivo* auf. Signifikante Unterschiede der Mikropartikel-Fractionen im Blutkreislauf wurden zwischen gesunden Individuen (George et al., 1986; Berckmans et al., 2001) und Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen, wie z. B. Sepsis, Diabetes mellitus, atherosklerotischen vaskulären Erkrankungen, starkem Bluthochdruck oder Nierenversagen,

gefunden (Diamant et al., 2002; Nieuwland et al., 2000; Mallat et al., 2000; Sabatier et al., 2002).

Zellulären Mikropartikeln werden entsprechend ihrer Herkunft verschiedene Funktionen zugeschrieben (Abbildung 1.1) und sie variieren in ihrer Größe von 0,1 - 2 μm .

1.1.2 Mechanismen der Mikropartikel-Bildung

Der Mechanismus der Vesikelfreisetzung ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Jedoch werden in der Literatur diverse Zellmoleküle beschrieben, die zumindest zu einem gewissen Grad zur Vesikel-Bildung beitragen. So sind z. B. kontraktile Proteine an der Freisetzung von Cytokinen in Verbindung mit Vesikeln von Monozyten beteiligt (Dainiak et al., 1988). Auch eine Trennung der Zytoskelettelemente ist für extrazelluläre Vesikelbildung notwendig. Stark metastatische Zellen, bei denen nur eine geringe Bindung zwischen der Plasmamembran mit dem Zytoskelett (Aktin und Vinkulin) vorliegt (Raz and Geiger, 1982), zeigen im Vergleich zu nicht metastatischen Zellen eine vermehrte Vesikelfreisetzung (Barz et al., 1985). Bei Erythrozyten und Thrombozyten führt der Anstieg intrazellulärer Calcium-Konzentrationen unter anderem zur Freisetzung von Membranvesikel (Allan and Thomas, 1981; Bucki et al., 1998).

Das Abschnüren von Membranen stellt ein Phänomen dar, bei dem eukaryontische Zellen Fragmente der Plasmamembran und zytoplasmatisches Material in den extrazellulären Raum freisetzen.

Zellmembranen eukaryontischer Zellen sind asymmetrische, flüssig-kristalline, dynamische Strukturen, die hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen bestehen. Sie enthalten Kohlehydrate, die mit den Lipiden und Proteinen verknüpft sind. Die meisten Membranen weisen eine Dicke zwischen 6 und 10 nm auf (Alberts et al., 1995).

Membranlipide sind Phosphoglyceride mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil, so dass sie in wässrigen Medien spontan geschlossene, meist bimolekulare Schichten ausbilden. Um einen selektiven Stoff- und Signaltransport durch diese Lipiddoppelschicht zu gewährleisten, ist diese mit spezifischen Membranproteinen ausgestattet, die als Ionenkanäle, Pumpen, Carrierproteine, Rezeptoren, Enzyme und Energieüberträger fungieren. Die Plasmamembran unstimulierter Zellen besteht aus einer Doppelschicht, in der die Phospholipide asymmetrisch verteilt sind. Neutrale ungeladene Phospholipide, wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, sind primär in der äußeren Membranschicht (exoplasmatisch) lokalisiert, während die negativ geladenen Phosphatidylserine und Phosphatidylethanolamine in der inneren Membranschicht (zytoplasmatisch) zu finden sind. Die asymmetrische

Verteilung der Phospholipide in der Plasmamembran wird aktiv durch drei verschiedene Enzyme aufrechterhalten (Sims and Wiedmer, 2001): (i) die Aminophospholipid-Translokase oder Flippase, eine nach innen gerichtete Pumpe, die für Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamine spezifisch ist, (ii) die Floppase, eine nach außen gerichtete Pumpe und (iii) eine Lipid-Scramblase, die unspezifische bidirektionale Umverteilungen entlang der Plasmamembran unterstützt (Beverly et al., 1999). Ein signifikanter Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} etwa führt zusammen mit einer Stimulation der Zelle zu einer Aktivierung der Scramblase und Floppase und der Hemmung der Flippase-Aktivität, worauf ein Zusammenbruch der Membran-Asymmetrie erfolgt.

Während einer Zellaktivierung und auch in der terminalen Phase der Apoptose löst sich die asymmetrische Verteilung der Plasmamembran und es kommt zu einer Translokation von Phosphatidylserinen von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite (Abbildung 1.2). Spezifische „rafts“, die durch einen hohen Anteil an Cholesterol in der Membran charakterisiert sind, werden bevorzugt als Membranvesikel z. B. von Erythrozyten abgesondert (Jy et al., 2002; Frenkel et al., 1986).

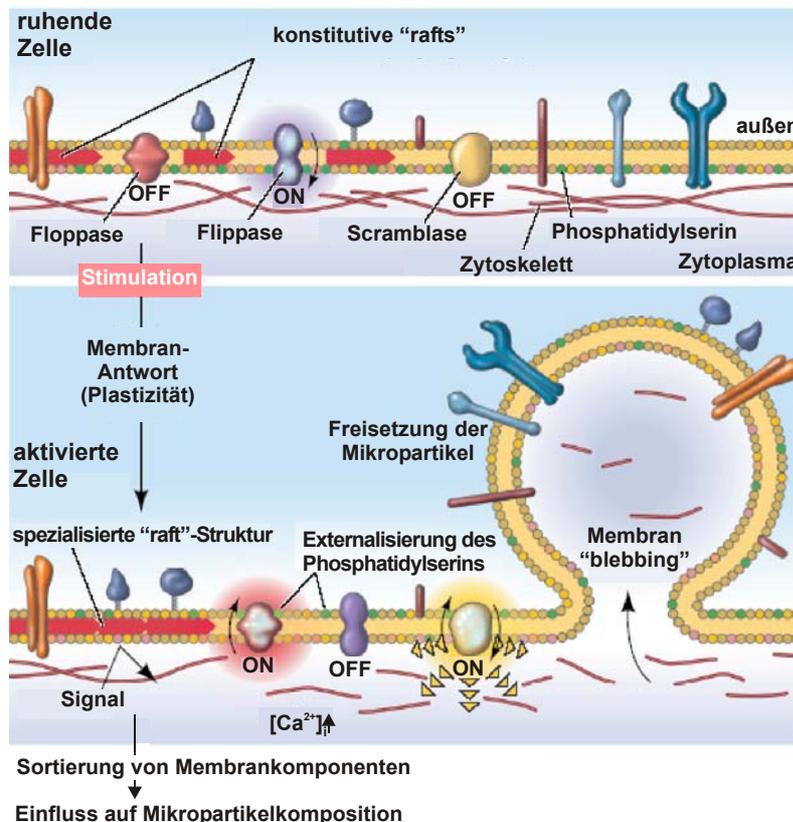


Abbildung 1.2: Einfluss von Stimulationen auf die Struktur der Plasmamembran und die Bildung von Mikropartikeln bei einer eukaryontischen Zelle (modifiziert nach Hugel et al., 2005).

1.1.2.1 Mikropartikel-Freisetzung unter physiologischen Bedingungen

Die Bildung und Freisetzung von Mikropartikeln scheint bei vielen Zellen aber auch ein physiologischer Prozess zu sein und findet unabhängig von äußeren Stimulationen oder von Apoptose statt (Beaudoin and Grondin, 1991). Unter physiologischen Bedingungen können Oberflächenmoleküle wie Immunglobuline und Rezeptoren, zusammen mit Plasmamembranfragmenten spontan von Lymphozyten freigesetzt werden (Uhr and Vitetta, 1973; van Blitterswijk et al., 1977). Transmembranproteine, wie der Chemokinrezeptor CCR5, werden fakultativ ohne Aktivierung in Form von Mikropartikeln von PBMCs (peripheren mononukleären Zellen) abgegeben und werden auf andere Zellen transferiert (Mack et al., 2000). Komponenten der Plasmamembran werden kontinuierlich von der Oberfläche gesunder, intakter Zellen, aber auch von malignen Zellen als Membranvesikel abgegeben (Dainiak, 1991). Bei malignen Zellen scheint die Vesikel-Freisetzung Einfluss auf das Überleben der Zellen zu nehmen, indem tumor-spezifische Antigene von der Plasmamembran abgesondert werden und so eine Erkennung durch das Immunsystem verhindert wird (Taylor and Black, 1985; Poutsika et al., 1985).

1.1.2.2 Apoptotische Membranvesikel

Beim programmierten Zelltod (Apoptose) handelt es sich um einen Prozess, bei dem alte, infizierte oder nach Immunreaktionen überzählige Zellen gefahrlos entfernt werden können (Thompson, 1995b). Apoptose ist charakterisiert durch die Aufhebung der Phospholipidasymmetrie der Plasmamembran, die Verdichtung des Zellkerns, die Fragmentierung der DNA und schließlich durch die Freisetzung von apoptotischen Membranvesikeln (Wyllie, 1980). Die Aktivierung intrazellulärer Enzyme der Familie der Caspasen ist ein wichtiger Mechanismus der Apoptose, der zur Spaltung von Proteinen des Zellzyklus, des DNA-Metabolismus, der Signaltransduktion und des Zytoskeletts führt (Nicholson and Thornberry, 1997). Die Bildung der apoptotischen Membranvesikel wird insbesondere durch eine Rho assoziierte Kinase (ROCK I) eingeleitet, die durch Caspase 3 aktiviert wurde (Coleman et al., 2001). Apoptotische Vesikel werden danach von Phagozyten erkannt und aufgenommen, wobei die Externalisierung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der apoptotischen Vesikelmembran eine grundlegende Rolle spielt (Fadok et al., 2001).

Im Gegensatz zu Mikropartikeln, die unter physiologischen Bedingungen von der Plasmamembran abgegeben werden, enthalten apoptotische Vesikel Fragmente des Zellkerns und Organellen, wie Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum (Kerr et al., 1972; Kim et al., 1996).

1.1.3 Zusammensetzung der Membrankomponenten von Mikropartikeln

Ein entscheidendes Merkmal für die Beteiligung der Mikropartikel an interzellulärer Kommunikation ist, dass der Inhalt und die Anzahl der Mikropartikel von der Donorzelle kontrolliert werden. Da das Abschnüren der Membranvesikel an bestimmten Stellen der Plasmamembran stattfindet, scheint dieser Prozess gerichtet und nicht zufällig abzulaufen (Armstrong et al., 1988).

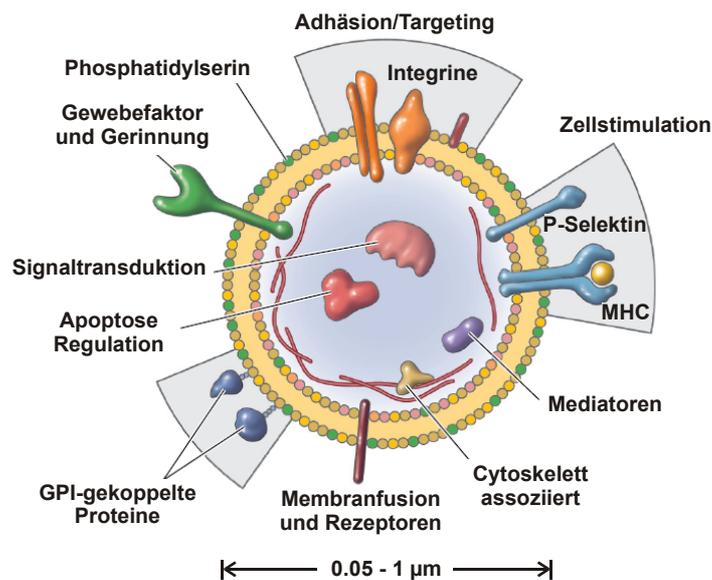


Abbildung 1.3: Zellulärer Mikropartikel (modifiziert nach Hugel et al., 2005).

Die Bildung der Mikropartikel stellt einen hochgradig regulierten Prozess dar. Für das Sortieren von Membranbestandteilen scheinen zwei verschiedene Mechanismen von Bedeutung zu sein. Zum einen wird der Sortierprozess durch Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen innerhalb und zwischen verschiedenen Membrandomänen reguliert. Zum anderen basiert er auf dem Zusammenspiel zwischen zytosolischen Proteinen und Transmembranproteinen, die in der Membrandoppelschicht verankert sind (Thiel et al., 2000).

Die Art der Verteilung von Oberflächenmolekülen auf Mikropartikeln variiert bei verschiedenen Zellen. So werden z. B. Membranproteine, die charakteristisch für eine Zelle und häufig auf deren Oberfläche exprimiert sind, bei der Abschnürung von Membranvesikeln nicht immer mit übertragen. Dementsprechend weisen Mikropartikel mit endotheliale Ursprung einen differenten Phänotyp auf, der nicht mehr dem der Endotheloberfläche entspricht (Abid Hussein et al., 2003). Auch die nach Stimulation von T-Zellen

freigesetzten Mikrovesikel zeigen nicht die Membranproteine auf der Oberfläche, die zu den häufigsten der Ursprungszelle gehören (Blanchard et al., 2002). Die Phospholipid-Zusammensetzung von Mikropartikeln, die von Thrombozyten gebildet werden, präsentieren unter anderem intrazelluläre Membranstrukturen von Organellen (Olas et al., 2002).

Dennoch sind auf Mikropartikel-Oberflächen auch verschiedene charakteristische Antigene zu finden, die hauptsächlich in der Membran der Ausgangszelle vorliegen (Abbildung 1.3); z. B. finden sich auf Mikropartikeln, die von Thrombozyten entstammen, Glykoprotein Ib (CD42b), Thrombozyten-Endothelium Adhäsionsmoleküle (PECAM-1, CD31), der Fibrinogenrezeptor, Integrin α IIb β 3 und auch Aktivierungsmarker wie P-Selektin (CD62P). Ähnlich sind Membranvesikel anderer Donorzellen charakterisiert. Mikropartikel von Erythrozyten exprimieren GlyophorinA, Mikropartikel von Granulozyten CD66, von Monozyten CD14, von Lymphozyten CD4 und CD8 und Mikropartikel von Endothelzellen exprimieren CD31, CD34, CD51 (Vitronectin), CD62E und CD146. (Berckmans et al., 2001; Joop et al., 2001; Abid Hussein et al., 2003).

1.1.4 Funktionelle Eigenschaften der Mikropartikel

1.1.4.1 Transfer bioaktiver Moleküle

Da Mikropartikel im Blutkreislauf auftreten sind sie in der Lage, sowohl lokal als auch an entfernten Stellen zu wirken. Den Mikropartikeln werden verschiedene Funktionen zugeordnet. So sind z. B. viele zirkulierende Entzündungsmarker, die häufig in löslicher Form vorliegen, wie etwa E-Selektin, PECAM-1 (CD31) oder Tissue Faktor (TF) auch zu einem bedeutenden Anteil an Mikropartikel gebunden. (Horstman et al., 2004).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Mikropartikel ist der Austausch von Membranproteinen. Membranvesikel verschiedenen Ursprungs können als Transporter-System für Rezeptoren fungieren, wobei sie durch den Transfer der Vesikel die Zielzellen insofern modifizieren, dass diese z. B. für neue, rezeptor-spezifische Stimuli empfänglich werden.

Mikropartikel von Leukozyten aktivieren z. B. Endothelzellen, indem sie leukozyten-spezifische Antigene übertragen. Diese phänotypische Umgestaltung der Endothelzelle führt zu einer Änderung der Phosphorylierung von zellulären Proteinen und deren Adhäsionseigenschaft (Mesri and Altieri, 1998; Tabibzadeh et al., 1994).

Der Transfer von Rezeptoren durch Mikropartikel verdeutlicht auch seine wichtige Funktion bei der Infizierung von Zellen durch HI-Viren. Das Antigen CD4 ist als alleiniger Rezeptor nicht in der Lage, den Eintritt von HIV in Zielzellen zu vermitteln. Zusätzlich sind Korezeptoren für die Fusion von HIV mit

der Wirtszelle erforderlich (Deng et al., 1996). Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 fungieren hier als Korezeptoren für T-trope bzw. M-trope Virusstämme. Verschiedene eukaryontische Zellen setzen CCR5 positive Mikropartikel frei, die von anderen Zellen, wie Monozyten, T-Zellen und Endothelzellen, aber auch von CCR5 defizienten PBMCs aufgenommen werden. Nach diesem Transfer steht CCR5 als HIV-Korezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle zur Verfügung die dann mit M-tropen HIV-1 Viren infiziert werden kann (Mack et al., 2000). Durch die Übertragung des CXCR4 Rezeptors auf CXCR4 negative Zellen mittels Mikropartikel, die von Thrombozyten und Megakaryozyten freigesetzt werden, konnte dieser Prozess untermauert werden (Rozmyslowicz et al., 2003). Der Transfer von Cytokin- und Chemokinrezeptoren auf hämatopoetische und maligne Zellen kann deren Zellaktivität, Proliferation, Überleben, Apoptose und Chemotaxis modifizieren (Kim et al., 2003).

Die meist beschriebene Eigenschaft von *in vitro* und *in vivo* Mikropartikeln, die von Thrombozyten sezerniert werden, ist ihre prokoagulante Aktivität (Berckmans et al., 2001; Nieuwland et al., 1997). Sie können aber auch biologisch aktive Komponenten auf hämatopoetische Zellen übertragen, die diese Mikropartikel internalisieren. Dadurch regulieren und stimulieren die Mikropartikel die Zellproliferation, das Überleben und die Chemotaxis hämatopoetischer Zellen (Baj-Krzyworzeka et al., 2002).

1.1.4.2 Mikropartikel und Entzündungen

Mikropartikel von Leukozyten sind in der Lage Endothelzellen direkt zu aktivieren und zu stimulieren, so dass diese inflammatorische Substanzen, wie Cytokine oder Chemokine produzieren (Mesri and Altieri, 1999; Barry et al., 1997; Barry et al., 1998). Von Thrombozyten freigesetzte Mikropartikel verstärken nicht nur die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten und Endothelzellen, sondern bewirken auch eine vermehrte Produktion von IL-8, IL-1 β und IL-6 durch Endothelzellen und zusätzlich von TNF- α durch THP-1 Monozyten (Nomura et al., 2001). Bei humanen THP-1 Monozyten wurde gezeigt, dass sie nach Aktivierung Mikrovesikel freisetzen, die das pro-inflammatorische Cytokin IL-1 β enthalten. Die IL-1 β Ausschüttung aus den Vesikeln folgt zeitlich verzögert nach der Zellaktivierung. (MacKenzie et al., 2001). Oxidierte Membranvesikel von Endothelzellen und apoptotische Membranvesikel tragen zum Verlauf von chronisch inflammatorischen Prozessen und der Entwicklung atherosklerotischer Schädigungen bei (Huber et al., 2002).

1.1.4.3 Immunregulatorische Eigenschaften apoptotischer Membranvesikel

Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren ist ausschlaggebend für die Erhaltung der Homeostase. Die Eliminierung apoptotischer Zellen durch Phagozyten findet im Gegensatz zur Nekrose, bei der es zu einer Schädigung der Gewebeumgebung und zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine kommt, auf einem nicht-entzündlichen Weg statt (Fadok et al., 1998b; Thompson, 1995b). Interaktionen zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen führen zur Sekretion von anti-inflammatorischen Mediatoren, wie TGF- β , IL-10 und PGE₂, und hemmen die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine (Fadok et al., 1998b; Huynh et al., 2002; Voll et al., 1997). Auch der Kontakt zwischen Monozyten und apoptotischen Zellen wirkt immunsuppressiv. Eine verstärkte Freisetzung von IL-10 und TGF- β , so wie eine geminderte TNF- α - und IL-1 β -Produktion ist hier zu beobachten (Byrne and Reen, 2002). Apoptotische Zellen beeinträchtigen auch die Reifung dendritischer Zellen und die Antigen-Präsentation (Stuart et al., 2002; Gallucci et al., 1999).

Der Mechanismus, durch den die apoptotischen Zellen Entzündungen und eine adaptive Immunantwort hemmen, ist noch nicht genau bekannt. Allerdings scheinen verschiedene Proteine, wie Thrombospondin, β 2-Glykoprotein, mannanbindendes Lektin (MBL), die Komplementkomponente iC3b und Phosphatidylserin dabei eine Rolle zu spielen (Henson et al., 2001; Mevorach et al., 1998; Savill and Fadok, 2000). Der Einfluss von Komplementkomponenten auf die regulatorischen Funktionen von apoptotischen Vesikeln wird unter 1.4.3 beschrieben.

Die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran ist eine bedeutende Veränderung auf der Oberfläche apoptotischer Zellen und verhindert die Immunantwort, indem eine Entzündung im Gewebe gehemmt wird (Hoffmann et al., 2005). Das Phosphatidylserin auf apoptotischen Vesikeln ist für die verminderte Produktion pro-inflammatorischer Cytokine und Stickoxid (NO) durch Makrophagen verantwortlich (Aramaki, 2000). Auch die Freisetzung von TGF- β durch Phagozyten wird durch Phosphatidylserin beeinflusst (Hoffmann et al., 2001; Fadok et al., 2001).

1.2 Internalisierung und Membranfusion

Für die Zellkommunikation ist neben der Mikropartikel-Freisetzung von der Zelloberfläche ebenso die Aufnahme der Vesikel durch Zielzellen entscheidend. Es können im Organismus verschiedenartige Mechanismen zur Vesikel-Aufnahme beobachtet werden, wobei diese Internalisierung von Stoffen und Molekülen über Vesikel meist von einer Membranfusion begleitet ist.

Die Fusion biologischer Membranen ist ein essentieller Schritt vieler zellulärer Prozesse. Die vielfältigen Aufgaben einer eukaryontischen Zelle, wie etwa Sekretion, Transport von Enzymen zu ihren Zielorganellen, Biosynthese von Membranproteinen, Internalisierung makromolekularer Verbindungen etc., sind auf die kontrollierte und spezifische Spaltung (Fission) oder Verschmelzung (Fusion) membranumhüllter Reaktionsräume angewiesen. So sind z. B. Transportvorgänge hochmolekularer Stoffe in einer Zelle, wie bei der Exo- und Endozytose mit einer Membranfusion verbunden. Sie ermöglicht außerdem die Transmitter-Übertragung an chemischen Synapsen, die Verschmelzung der Gameten im Rahmen der geschlechtlichen Fortpflanzung oder der Myoblasten während der Myogenese, bei der sich vielkernige Skelettmuskelzellen bilden. Desgleichen ist bei der Phagozytose die Aufnahme von Fremdstoffen durch Phagozyten mit einer Membranfusion verbunden. Auch für Viren, die von einer Lipiddoppelschicht als Hülle umgeben sind, ist die Fusion mit der Zielzelle von großer Bedeutung.

1.2.1 Endo- und Exozytose

Ein Austausch von Molekülen zwischen Zellen und Zellkompartimenten wird über Transportvesikel ausgeführt, die ebenso wie ihre Zielstrukturen von einer Lipidmembran umschlossen sind. So werden bei der Exozytose sekretorische Proteine am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und in sekretorische Granula verpackt, welche später mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren. Der gegensätzliche Prozess, bei dem die Zelle Materie (von Molekülen bis einzellige Organismen) aufnimmt, wird Endozytose genannt. Dabei umfließt die Membran das Material und schließt es in Vesikel (Endosomen) ein. Der klassische endozytotische Weg ist ein selektiver Transport und verläuft über „clathrin-coated“ Vesikel, endosomales Kompartiment und Lysosomen (Maxfield and McGraw, 2004). Bei dieser rezeptorvermittelten Endozytose wird Clathrin in die intrazelluläre Membranschicht eingelagert und ein „coated pit“ (ummantelte Vertiefung) entsteht, woraus sich dann ein „clathrin-coated“ Vesikel abschnürt. Eine zweite Art der Endozytose ist die Clathrin-unabhängige Endozytose durch Caveolen (lat. Caveolae). Diese sind als eine spezielle Form der „lipid rafts“ definiert und

bestehen aus cholesterol- und glycosphingolipidreichen Membrandomänen. Im Gegensatz zur Clathrin-vermittelten Endozytose, bei der die Internalisierung nach ca. 15 min abgeschlossen ist, läuft die Endozytose durch Caveolen wesentlich langsamer (10 – 20 h) ab. Neben ihrer Funktion bei der Signalübertragung, der Transzytose und dem Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum spielen Caveolen auch eine Rolle bei der Internalisierung von Membrankomponenten, extrazellulären Liganden, Toxinen und Viren (Fittipaldi et al., 2003).

1.2.2 Phagozytose

Bei der Phagozytose werden neben der Aufnahme und intrazellulären Verdauung zahlreicher Mikroorganismen auch veränderte und apoptotische Zellen beseitigt. Die Phagozytose von Fremdstoffen wird durch deren Anlagerung an den Phagozyten eingeleitet. Es werden zwei Typen von Phagozyten unterschieden: professionelle und nicht-professionelle Phagozyten. Monozyten, Neutrophile, Mikroglia, dendritische Zellen und Makrophagen zählen, durch ihre sehr hohe Effizienz Zellen und Partikel aufzunehmen, zu den professionellen Phagozyten. Aber auch die meisten anderen Zellen (nicht-professionelle Phagozyten) besitzen, wenn auch eine geringere und retardierte, Kapazität zur Aufnahme von toten oder apoptotischen Zellen (Parnaik et al., 2000). Das Anheften an Phagozyten kann durch unspezifische Bindungskräfte oder unter Beteiligung von Rezeptormolekülen auf der Plasmamembran stattfinden. Zu den spezifischen Phagozytose-Rezeptoren gehören u. a. der LPS-Rezeptor CD14, Rezeptoren für Immunglobulin G, Rezeptoren für Komplementkomponenten, Fibronectin-Rezeptoren und Rezeptoren für das C-reaktive Protein (Huber et al., 1968; Reynolds et al., 1975).

Für die Erkennung und Aufnahme von apoptotischen Vesikeln sind neben dem LPS-Rezeptor CD14 auch β_1 Integrine, Scavenger Rezeptoren der Klasse A und B, der Glykoprotein IV-Rezeptor (CD36), Lektine, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor (MER) und ein spezifischer Phosphatidylserin-Rezeptor auf der Phagozytenmembran beteiligt (Fadok and Chimini, 2001; Savill and Fadok, 2000). Damit jedoch der Phagozyt zwischen apoptotisch und nicht-apoptotisch unterscheiden kann, bedarf es spezifischer Merkmale. Dazu gehören die Translokation von Phosphatidylserin, Veränderungen des Glykosilierungsmusters und weitere Veränderungen der Zelloberflächen (Savill, 1997; Platt et al., 1998).

Nach der Erkennung und Bindung durch Oberflächenantigene (LPS, Phosphatidylserin etc.) der zu phagozytierenden Partikel an die Phagozyten-Rezeptoren folgt eine Invagination (Einstülpung) der Membran, bis

schließlich der gesamte Partikel umhüllt ist und sich in einer Phagozytenvakuole, dem Phagosom, befindet. Die Membranen der Phagosomen fusionieren mit Lysosomen, und die phagozytierten Fremdstoffe werden durch hydrolytische Enzyme verdaut.

1.2.3 Membranfusion durch SNARE-Proteine

Bei intrazellulären Fusionen von Organellen und Vesikeln sind unter anderem auch Proteine der Familie der SNAREs (*soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor*) involviert. Verschiedene Mitglieder dieser SNARE-Familie fungieren als Fusionsproteine bei sekretorischen und endozytotischen Funktionswegen (Guo et al., 2000; Pelham, 2001).

Die am besten charakterisierten SNARE-Proteine sind jene, welche die Neurotransmitter-Freisetzung (Exozytose) der präsynaptischen Membranvesikel bewerkstelligen (Sollner et al., 1993). An dieser Reaktion sind maßgeblich drei membrangebundene SNARE-Proteine beteiligt: Syntaxin 1A (Bennett et al., 1992), SNAP-25 (*25 kDa synaptosome associated protein*) (Oyler et al., 1989) und Synaptobrevin (auch als VAMP (*vesicle associated membrane protein*) bezeichnet) (Baumert et al., 1989). Ursprünglich wurden die SNAREs in zwei Gruppen unterteilt: v-SNAREs, die mit der vesikulären Membran assoziiert sind und t-SNAREs, die sich auf der Zielmembran (*targetmembrane*) finden. Synaptobrevin zählt zu den v-SNAREs, während Syntaxin und SNAP-25 zu den t-SNAREs gehören. Jedoch hat sich gezeigt, dass v-SNAREs und t-SNAREs auf Vesikeln und Zielmembranen koexistieren können. Um Konfusionen zu vermeiden, wurde die Klassifizierung der SNAREs, basierend auf hoch konservierten Arginin (R)- und Glutamin (Q)-Resten in ihrer SNARE-Domäne, erneuert: in R-SNAREs (z. B. Synaptobrevin) und Q-SNAREs (z. B. SNAP-25 und Syntaxin 1A).

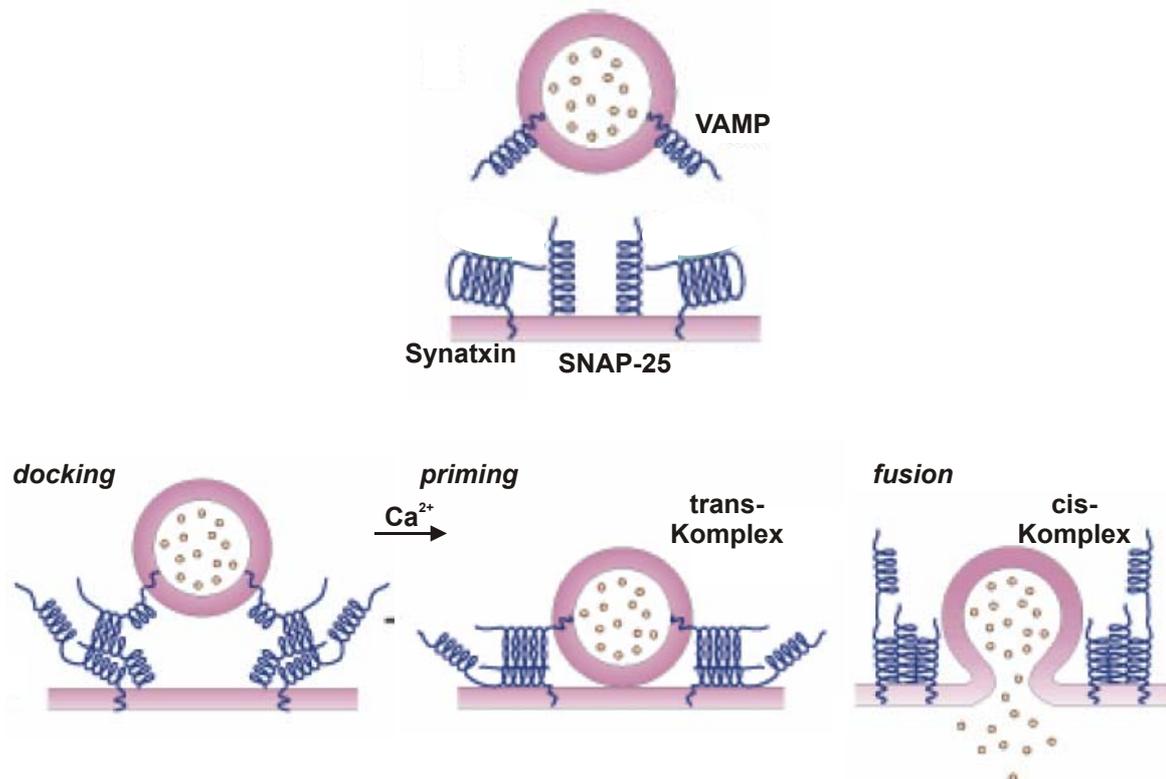


Abbildung 1.4: Mechanismus der SNARE-vermittelten Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran. (modifiziert nach Chen and Scheller, 2001)

Die durch SNAREs verursachte Membranfusion kann in drei Schritte (*docking*, *priming* und *fusion*) gegliedert werden (Abbildung 1.4). Zunächst werden die SNAREs durch Dissoziation assoziierter Proteine und durch Calcium in einen reaktiven Zustand gebracht und können sich aneinander lagern (*docking*, *priming*). Es bildet sich zwischen den beteiligten Proteinen ein sog. trans-Komplex, wobei sich die v- und t-SNAREs zunächst erkennen, dann einen biochemisch stabilen Komplex ausbilden, die Vesikel in räumliche Nähe zu der Zielmembran bringen, sich aber noch auf verschiedenen Membranen befinden. Erst dann kommt es zur Formation des cis-Komplexes (*fusion*), nachdem sich die v- und t-SNAREs auf einer Membran verankern und die Membranen fusionieren (Sudhof, 2004).

1.2.4 Annexin-vermittelte Membranfusion

Zu den Proteinen, die eine elementare Voraussetzung für die Membranfusion bieten, zählen auch die Annexine. Die Familie der Annexine umfasst mindestens 13 weit verbreitete Proteine, die durch zwei Eigenschaften charakterisiert sind; sie zeigen eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an saure Phospholipide und sie

enthalten konservierte Sequenzelemente von ca. 70 Aminosäuren. Bislang ist es gelungen, die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der 13 bekannten Annexine im Wesentlichen aufzuklären. Über die Funktionen *in vivo* wird noch immer diskutiert, da bis heute noch keinem der bekannten Annexine eine spezifische Funktion zugeordnet werden kann. Jedoch werden den Annexinen, die eine meist zytosolische, membrangebundene Lokalisation aufweisen, Funktionen bei der Regulation der Membranorganisation, der Membranfusion und des Membrantransportes, bei der Bildung von Ionenkanälen und bei der Membran-Zytoskelett-Verankerung zugeschrieben. Basierend auf biochemischen Eigenschaften, wie z. B. der Hemmung der Phospholipase A₂, Beeinflussung der Koagulation und der Bindung an bestimmte Matrix- und extrazelluläre Komponenten, wird angenommen, dass einige Annexine als anti-inflammatorische und anti-koagulante Komponenten und als Mediatoren und Regulatoren bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, fungieren (Gerke and Moss, 1997).

Ihre Eigenschaft Fusionsprozesse herbeizuführen erbrachte die Beobachtung, dass einzelne Annexine, darunter Annexin I, II, VI und XIII, auf endosomalen Membranen, Caveolen, *clathrin-coated* Vesikeln und anderen Membrankompartimenten, die Endo- und Exozytose vermitteln, identifiziert wurden (Gruenberg and Emans, 1993; Creutz, 1992; Emans et al., 1993).

Annexin V (auch Lipocortin V, Endonexin II oder Anchorin CII genannt) ist durch seine hohe Affinität an Phosphatidylserin charakterisiert und besitzt die Fähigkeit spannungs-abhängige Calcium-Kanäle zu bilden (Hofmann et al., 1997). Als exogenes Phosphatidylserin-bindendes Protein weist Annexin V anti-koagulante (van Heerde et al., 1994), anti-apoptotische (Gidon-Jeangirard et al., 1999) und anti-inflammatorische (Reutelingsperger and van Heerde, 1997) Effekte auf. Ferner konnte in Neuronen eine Assoziation von Annexin V an synaptische Vesikel und eine Fusionsfunktion bei der exozytotischen Transmitter-Freisetzung beobachtet werden (Gotow et al., 1996).

1.2.5 Membranfusion durch Tetraspanine

Die Familie der Tetraspanine umfasst bislang 26 bekannte Mitglieder. Sie sind durch vier Transmembrandomänen, eine kleine und eine große extrazelluläre Schleife, sowie durch kurze N- und C-terminale intrazelluläre Domänen, charakterisiert. Die Tetraspanin-Moleküle CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151 sind ubiquitär im Gewebe verteilt, während z. B. CD53 nur von Leukozyten und CD37 von B-Zellen exprimiert wird. Tetraspanine bilden Homo- und Hetero-Multimere, die sich zu einem dynamischen Netzwerke (sog. Tetraspanin-Mikrodomänen) formieren und häufig mit Integrinen assoziiert vorliegen. Die genauen Funktionen sind bislang noch nicht geklärt, dennoch

wird ihnen eine bedeutende Rolle in der Membran-Biologie, z. B. bei der Zelladhäsion, Migration, Signaltransduktion und bei der Vesikel-Fusion und -Fission, zugeschrieben.

Das Tetraspanin CD9 ist stark auf Oozyten exprimiert und an der Verschmelzung dieser Zellen mit Spermien beteiligt. Blockierende Antikörper gegen CD9 reduzieren diesen Fusionsprozess (Chen et al., 1999). Ebenso können Antikörper gegen CD9, CD81 und CD82 eine durch Viren induzierte Zell-Zell-Fusion blockieren (Willett et al., 1997; Loffler et al., 1997). Ferner ist CD9 zusammen mit CD81 in die Fusion von Muskelzellen involviert (Tachibana and Hemler, 1999). Auf Exosomen, die von B-Zellen gebildet werden und als interzelluläre Kommunikations-Vesikel fungieren, sind die Tetraspanine CD9, CD53, CD63, CD81 und CD82 angereichert (Escola et al., 1998).

1.3 Das Komplementsystem

Der Begriff Komplement wurde 1899 von Paul Ehrlich eingeführt und beschreibt die hitzeempfindliche Aktivität eines Bestandteiles des normalen Plasmas, der die Opsonierung von Bakterien durch Antikörper verstärkt und es einigen Antikörpern ermöglicht Bakterien zu töten. Von dieser Aktivität wurde gesagt, sie komplementiere die antibakterielle Aktivität der Antikörper (Ehrlich und Morgenroth, 1899). Das Komplementsystem umfasst über 20 Serumproteine und mindestens 10 weitere, membranständige Proteine und Rezeptoren, die im Serum bzw. im Gewebe vorhanden sind. Es handelt sich hierbei um Proteine, die primär von Hepatozyten, sowie von Makrophagen und Fibroblasten gebildet werden.

Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Immunantwort und bei Entzündungsprozessen (Muller-Eberhard, 1988). Dabei stellt es einen bedeutenden Mechanismus dar, durch den eine Antigenerkennung in eine effiziente Verteidigung gegen Infektionen umgesetzt wird.

Eine der drei wesentlichen Funktionen des Komplementsystems ist die Übernahme von Abwehrleistungen im Sinne einer unspezifischen humoralen Immunabwehr in der Präimmunphase einer Infektion. Diese erfolgt durch die Zerstörung von Zellen durch Bildung eines lytischen membranangreifenden Komplexes (membrane attack complex, MAC). Die zweite wichtige biologische Aufgabe ist die Aktivierung von basophilen Granulozyten und Makrophagen durch Abbauprodukte der Komplementproteine, z. B. C5a, das eine zielgerichtete Chemotaxis dieser Zellen einleitet. Die dritte Funktion des Komplementsystems ist die Opsonierung von Pathogenen, d. h. Zellen für die Phagozytose zu markieren, indem sie mit Komplementkomponenten besetzt werden (Frank and Fries, 1991).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Reaktionswege erfolgen: dem klassischen, dem alternativen oder dem Lektin-Aktivierungsweg. Diese Wege gleichen sich in ihrer funktionellen Organisation, indem sie eine Enzymkaskade darstellen, in deren Verlauf inaktive Vorstufen durch limitierte Proteolyse oder katalytische Konformationsänderungen in enzymatisch aktive Komponenten umgesetzt werden (Abbildung 1.5). Dieser Mechanismus führt zu einer deutlichen Amplifikation des ursprünglichen Signals. Die Bildung einer C3-Konvertase, die C3 in das Anaphylatoxin C3a und die aktivierte Form C3b spaltet, stellt das zentrale Ereignis der Komplementaktivierung dar. Schließlich wird eine C5-Konvertase gebildet, die C5 in C5a und C5b spaltet. C5b dient dann als Initiator des terminalen, lytischen Weges in den alle Aktivierungswege führen, indem C5b zur Bildung des membranangreifenden Komplexes und schließlich zur Lyse des detektierten Pathogens beiträgt (Janeway, 1997).

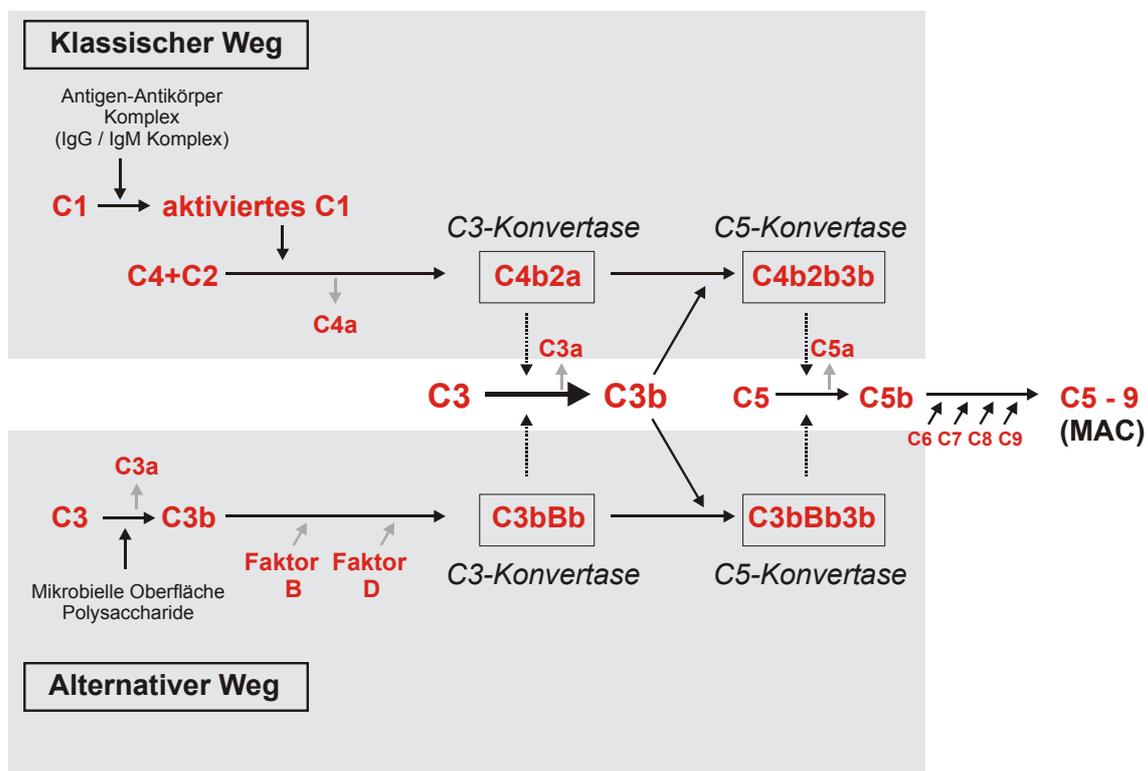


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Komplement-Aktivierung durch den klassischen und alternativen Weg.

1.3.1 Der klassische Aktivierungsweg

Der klassische Komplementweg wird durch antigen-gebundene IgM- und IgG-Antikörper aktiviert, wenn diese mit der Komplementkomponente C1 interagieren. Die Antigene können sowohl in löslicher Form (Makromolekül, Vesikel, Mikropartikel), als auch in fester Form (z. B. eine Zelle) zur Verfügung stehen. Der C1-Komplex setzt sich aus einer C1q-Komponente und einem Tetramer aus je zwei C1r- und C1s-Komponenten zusammen. Das Anheften von C1q an ein einziges gebundenes IgM-Molekül oder an die Fc-Fragmente von mindestens zwei IgG-Molekülen führt zur Aktivierung einer enzymatischen Aktivität von C1r (Schumaker et al., 1987; Sim and Reid, 1991). Die aktive Form von C1r spaltet dann sein assoziiertes C1s ab, wodurch eine aktive Serinprotease entsteht, die C4 und anschließend C2 spaltet. Die an dieser Stelle gebildeten C4b- und C2a-Fragmente bilden die C3-Konvertase des klassischen Weges. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Spaltung vieler C3-Moleküle in C3b, welche an die Pathogenoberfläche binden und von Komplementrezeptoren auf phagozytierenden Zellen erkannt werden. Durch Bindung von C3b an C4b2a entsteht als nächstes in der Kaskade C4b2a3b und damit die C5-Konvertase. Die Spaltung von C5 resultiert in der Bildung des Anaphylatoxins C5a und C5b (Porter and Reid, 1978), an dem in einem nicht-enzymatischen Prozess der membranangreifende Komplex aufgebaut wird.

Die Aktivierung des klassischen Weges ist nicht ausschließlich Antikörper-vermittelt, da C1 auch an Nukleinsäuren, Chromatin, Bakterien und Viren bindet (Sim and Malhotra, 1994). Ebenso wurde beschrieben, dass C1q an apoptotische Zellen und apoptotische Vesikel bindet um somit deren Phagozytose einzuleiten (Korb and Ahearn, 1997).

1.3.2 Der alternative Aktivierungsweg

Der alternative Weg ist der phylogenetisch älteste Teil des Komplementsystems und benötigt im Gegensatz zum klassischen Weg zur Aktivierung keine Antikörper (Gotze and Muller-Eberhard, 1976). Das erste Enzym des alternativen Wegs ist die Komplementkomponente C3, die in geringem Maße spontan im Plasma durch nicht-enzymatische Hydrolyse der intramolekularen Thioester-Bindung entsteht (Isenman et al., 1981; Tack et al., 1980). C3b lagert sich an die Oberfläche von Pathogenen an und bindet Faktor B, welcher dadurch der Spaltung durch den Plasmaproteasefaktor D zugänglich wird. So entsteht der C3bBb-Komplex, die C3-Konvertase des alternativen Weges, die viele C3-Moleküle schneidet und sich infolgedessen noch mehr aktive C3b-Moleküle auf der Pathogenoberfläche bilden. Durch die Bindung von C3b an C3bBb entsteht die C5-Konvertase C3bBb3b (Daha et al., 1976; Hong et al.,

1991). Das somit entstehende C5b-Molekül regt nun die Bildung des membranangreifenden Komplexes an.

1.3.3 Der Lektin Aktivierungsweg

Beim Lektin-Weg findet eine Antikörper- und C1-unabhängige Ausbildung der C3-Konvertase statt. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines mannanbindenden Lektins (MBL) mit Polysaccharid-Resten, insbesondere Mannose- und N-Acetylglukosamin-Resten auf der Oberfläche von Hefen, Viren und Bakterien (Thompson, 1995a). Ähnlich dem klassischen Weg mündet die Aktivierung auch hier in der Ausbildung der C3-Konvertase C4b2a.

1.3.4 Das Komplementprotein C3

Das Serum-Komplementprotein C3 ist die zentrale Komponente des klassischen, alternativen und des Lektin-Aktivierungsweges. In der proteolytischen Aktivierung von C3 laufen die Aktivierungswege zusammen. Mit einer Konzentration von 1,3 mg/ml in humanem Plasma ist C3 das am häufigsten vorkommende Komplementprotein. C3 ist ein aus zwei Ketten bestehendes Glykoprotein und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa. Die α -Kette (115 kDa) und die β -Kette (75 kDa) sind kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Janatova and Gobel, 1985).

Die C3-Konvertasen C3bBb und C4b2a aktivieren C3 und spalten im N-terminalen Bereich der α -Kette ein C3a Fragment (9 kDa) ab. Durch die Spaltung wird im verbleibenden C3b Fragment (180 kDa) ein hochreaktiver Thioester exponiert, der eine kovalente Bindung an Zelloberflächen ermöglicht (Tack et al., 1980). Das C3b Fragment besitzt eine Vielzahl von Bindungsstellen für andere regulatorische Komplementproteine (Faktor H, Faktor I), -Rezeptoren (CR1) und -Regulatoren. Faktor I, eine Serinprotease, spaltet das C3b Fragment in die Abbauprodukte C3dg und iC3b. iC3b ist inaktiv, verbleibt auf der Oberfläche von Pathogenen und wird dort durch den B-Zell-Komplementrezeptor CR2 (CD21) erkannt (Law and Dodds, 1997).

1.3.5 Komplementrezeptoren

Die regulatorische Funktion des Komplementsystems basiert auf der spezifischen Erkennung und Aufnahme C3-opsonierter Pathogene durch Komplementrezeptoren. Die folgenden Effekte sind abhängig vom Rezeptortyp und der Zelle. In Tabelle 1.1 sind die fünf bekannten Rezeptortypen, die Komplementkomponenten binden können, aufgeführt.

Tabelle 1.1: Verteilung und Funktionen von Komplementrezeptoren.

Rezeptor	Spezifität	Zelltypen	Funktionen
CR1 (CD35)	C3b, C4b, C1q	Erythrozyten, Makrophagen, Monozyten, B- Zellen, Granulozyten	Zerfall von C3b und C4b, stimuliert die Phagozytose
CR2 (CD21)	C3d, C3dg, iC3b, Epstein-Barr- Virus	B-Zellen, follikuläre dendritische Zellen	Teil des B-Zell- Corezeptors
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten	stimuliert die Phagozytose
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten	stimuliert die Phagozytose
C1q-Rezeptor	C1q	B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen	Bindung von Immunkomplexen an Phagozyten

Komplementrezeptor CR1 (CD35) wird auf zirkulierenden Monozyten und Neutrophilen exprimiert, am häufigsten jedoch auf B-Lymphozyten. CR1 ist einerseits durch seine Spezifität für Ligandenbindung, andererseits durch die Komplement-regulierende Aktivität, als ein multifunktionaler Rezeptor charakterisiert (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Als Komplementrezeptor bindet CR1 die Komplementfragmente C3b, C4b, iC3b, C1q und MBL und induziert dadurch die Phagozytose-Aktivität (Nicholson-Weller and Klickstein, 1999). C3b kann jedoch die Phagozytose über CR1 nicht alleine anregen. C3b verstärkt die durch Bindung von IgG an den Fc γ -Rezeptor induzierte Phagozytose. CR1 auf Erythrozyten erkennt Immunkomplexe und entfernt sie aus dem Blutkreislauf.

Komplementrezeptor CR2 (CD21) wird auf reifen B-Zellen und B-Zell-Linien (Iida et al., 1983), sowie auf follikulären dendritischen Zellen (Reynes et al., 1985), aktivierten T-Zellen (Fischer et al., 1991) und verschiedenen anderen Zelltypen (Carroll, 1998; Fearon and Carroll, 2000) exprimiert. CD21 auf B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen ist an der Erkennung und Bindung

von Immunkomplexen beteiligt, während die Funktion auf T-Zellen und anderen Zelltypen bislang unbekannt ist. Die Opsonierung von Antigenen durch C3b und C3d und die nachfolgende Bindung an die Komplementrezeptoren CR1 und CR2 verstärken die Antigen-Aufnahme durch B-Zellen und modifizieren nachfolgende Ereignisse, wie die Bindung von Peptiden an MHC- (*major histocompatibility complex*; Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse I-Moleküle (Nielsen and Leslie, 2002; Nielsen et al., 2002). CD21 bildet in der Plasmamembran reifer B-Zellen einen Signaltransduktions-Komplex mit CD81, Leu-13 und CD19. Dieser Komplex verstärkt das Signal, welches durch spezifische Antigene auf den B-Zell-Rezeptor übertragen wird und reduziert die Schwelle von Antigenen für die Induktion der Zellproliferation (Dempsey et al., 1996).

Die Hauptfunktion der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) ist die Phagozytose von C3b- und iC3b-opsonierten Pathogenen. CR3 ist am häufigsten auf zirkulierenden Monozyten, Neutrophilen und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) exprimiert, während CR4 besonders auf Gewebe-Makrophagen zu finden ist (Myones et al., 1988). Diese Komplementrezeptoren erkennen neben iC3b auch verschiedene Proteine und Liganden, wie z. B. extrazelluläre Matrixproteine, Koagulationsproteine, intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (Li, 1999) oder Lipopolysaccharide. Dadurch werden Makrophagen stimuliert, die wiederum die Beseitigung von Pathogenen, toxischen Abfallstoffen und apoptotischen Zellen vermitteln (Ehlers, 2000).

1.4 Mikropartikel und das Komplementsystem

1.4.1 Opsonierung von Mikropartikeln

Bei der Opsonierung binden Komplementproteine (Opsonine) an die Oberfläche körperfremder Organismen oder Partikel. Dies setzt die Komplementkaskade in Gang und unterstützt dadurch die Phagozytose.

Der alternative Komplementaktivierungsweg ist ein primärer Verteidigungsweg, der durch bakterielle Polysaccharide, virus-infizierte Zellen oder durch andere Substanzen, während der Abwesenheit spezifischer Antikörper, aktiviert wird. C3b-Moleküle binden dabei kovalent an die Oberfläche der Aktivatoren und opsonieren diese, was dann zu einer Bildung des lytischen membranangreifenden Komplexes führt.

Mikropartikel, die artifiziell hergestellt werden (sog. Liposome) und Phosphatidylethanolamine und/oder Phosphatidylserine enthalten, aktivieren den alternativen Aktivierungsweg in Anwesenheit von humanem Serum (Mold,

1989; Chonn et al., 1991; Comis and Easterbrook-Smith, 1986). Eine Deoxygenierung von Erythrozyten, die von Patienten mit Sichelzellanämie stammen, führt zur Externalisierung von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Auch diese Zellen verursachen durch C3b-Anlagerungen die Aktivierung des alternativen Komplementweges (Wang et al., 1993). Subpopulation von Mikropartikeln, die aus humanem Plasma isoliert sind, können dadurch, dass sie mit Komplementkomponenten, wie C1q, C3 und C4, opsoniert sind, das Komplementsystem aktivieren (Nauta et al., 2003b).

Komplementkomponenten, die am alternativen Aktivierungsweg beteiligt sind, dienen als Opsonin, um die Erkennung und Phagozytose von Phosphatidylserin-externalisierenden Membranvesikeln oder Liposomen, durch Makrophagen zu vermitteln (Liu et al., 1995). Im Plasma sind Opsonine, wie Antikörper, Kollektine, Pentraxine und Komplementkomponenten, kontinuierlich präsent. Opsonierung von Mikropartikeln ist ein Mechanismus zur Aufnahme und phagozytotischen Beseitigung dieser Membranvesikel.

1.4.2 Opsonierung apoptotischer Zellen

Komplementkomponenten opsonieren auch apoptotische Zellen und dienen als Liganden für Komplementrezeptoren. Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose lässt sich morphologisch von der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose unterscheiden (Kaplan, 1977) und induziert keine pro-inflammatorische Immunantwort (Wright et al., 1983; Aderem et al., 1985).

Die Externalisierung von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen ist für die Opsonierung mit iC3b verantwortlich (Mevorach et al., 1998), jedoch können auch Proteine, wie IgM und das C-reaktive Protein (CRP) dazu beitragen (Gershov et al., 2000; Kim et al., 2002).

Während der Lektin- und der alternative Aktivierungsweg primär einen direkten Zielerkennungs-Mechanismus nutzen, wird der klassische Aktivierungsweg hauptsächlich über die Bindung von C1q an gebundene IgG- oder IgM-Antikörper aktiviert. C1q kann aber auch direkt an apoptotische Vesikel binden (Navratil et al., 2001), wodurch eine Komplementaktivierung mit anschließender Ablagerung von C3b und C4b induziert wird (Nauta et al., 2002). Eine indirekte Bindung von C1q an apoptotische Zellen findet über verschiedene Mediatoren, wie IgM, CRP oder Pentraxin-3 statt (Kim et al., 2002; Gershov et al., 2000; Rovere et al., 2000; Nauta et al., 2003a). MBL, ein Ligand, der den Lektin Aktivierungsweg aktiviert, kann über seine Lektin-Domäne apoptotische Zellen opsonieren (Ogden et al., 2001). Diese Interaktion führt allerdings nicht zur Aktivierung der Komplementkaskade (Nauta et al., 2003b).

Apoptotische Zellen aktivieren auch den alternativen Aktivierungsweg, was zur Deposition von iC3b auf der Oberfläche von Phosphatidylserin-

externalisierenden Zellen führt. Bei der Erkennung von iC3b durch CR3 und CR4 auf Makrophagen und dendritischen Zellen handelt es sich um den effektivsten Mechanismus zur Aufnahme von apoptotischen Zellen (Mevorach et al., 1998; Morelli et al., 2003). Eine Opsonierung durch iC3b ist nicht nur für die Internalisierung apoptotischer Zellen verantwortlich, sondern induziert auch Immunsuppression und Toleranz (Takizawa et al., 1996; Hammerberg et al., 1998).

1.4.3 Immunregulatorische Eigenschaften von opsonierten Zellen

Phagozytose apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten stellt einerseits einen Weg dar, die Freisetzung schädlicher intrazellulärer Stoffe zu verhindern, andererseits wird die Phagozyten-Funktion aktiv modifiziert. Über den Einfluss der Opsonine, die apoptotische Zellen markieren, auf die Immunmodulation ist bislang wenig bekannt.

Phagozytose apoptotischer, neutrophiler Zellen durch humane Makrophagen inhibiert aktiv die Cytokin- und Chemokinproduktion (IL-1 β , IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- α) und verstärkt die TGF- β -Bildung (Fadok et al., 1998b), wobei Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen erforderlich ist (Huynh et al., 2002). Den Makrophagen ähnlich, wird die Cytokinproduktion von dendritischen Zellen nach einer Interaktion mit apoptotischen Zellen supprimiert (Stuart et al., 2002). Auch apoptotische Zellen, die mit CRP oder Komplementkomponenten opsoniert sind, induzieren eine TGF- β Expression bei Makrophagen (Gershov et al., 2000). Eine Stimulation der iC3b-Rezeptoren CR3 und CR4 retardiert die Cytokinproduktion dendritischer Zellen, sie sezernieren weniger IL-1 α , IL-2 β , IL-6, IL-12 und TNF- α , wobei der Effekt auf die immunregulatorischen Mediatoren TGF- β , IL-1ra (IL-1 Rezeptor-Antagonist) und MIF (Migrations-Inhibitions-Faktor) unverändert bleibt (Morelli et al., 2003).

Die Bindung iC3b-opsonierter Partikel an Komplementrezeptoren ruft eine anti-inflammatorische Antwort hervor, was durch eine herunterregulierte IL-12- und IFN- γ -Produktion bei Monozyten demonstriert wurde (Marth and Kelsall, 1997; Grazia Cappiello et al., 2001; Sutterwala et al., 1998). Eine Interaktion zwischen iC3b-opsonierten apoptotischen Zellen und unreifen dendritischen Zellen bewirkt neben einer erhöhten Aufnahme-Effizienz auch die Herunterregulierung der Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, CD86, β 2-Integrinen, und den Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 und eine Hochregulierung der CCR7-Expression (Verbovetski et al., 2002). Der Eliminierung von apoptotischen Zellen, die mit Komplementkomponenten opsoniert sind, und der daraus resultierenden immunsupprimierenden Regulation, könnte eine besondere Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Toleranz zukommen.

1.5 Das Immunsystem

Mikropartikel treten hauptsächlich im Blut auf und können somit durch größere Distanzen im gesamten Organismus transportiert werden und fungieren. Sie werden durch verschiedene eukaryontische Zellen abgesondert und auch wieder aufgenommen. Besonders aber stehen hierbei die Zellen des Immunsystems im Vordergrund. In der vorliegenden Arbeit werden der Transfer von Mikropartikeln und die Auswirkung der Mikropartikel-Aufnahme auf PBMCs, im Besonderen auf Monozyten und Lymphozyten, untersucht. In folgendem Kapitel werden diese Immunzellen und ihre allgemeinen Funktionen im Immunsystem beschrieben.

1.5.1 Die Rolle der Lymphozyten im Immunsystem

Die Lymphozyten machen ca. 35 % der Leukozyten im humanem Blut aus, wovon der Anteil der B-Lymphozyten ca. 15 %, der T-Lymphozyten ca. 70 % und der NK-Zellen ca. 15 % entspricht. Auf ihrer Oberfläche exprimieren die unterschiedlichen Lymphozyten-Populationen verschiedene Membranproteine, so genannte „Cluster of Differentiation“ (CD)-Moleküle, die als phänotypische Marker zur Unterscheidung der Zelltypen dienen.

1.5.1.1 B-Lymphozyten

Durch ihre Eigenschaft Antikörper und Cytokine zu produzieren und Immunglobuline und MHC-Moleküle zu exprimieren, dienen die B-Lymphozyten der humoralen Immunabwehr (Cooper, 1987; Pistoia, 1997). Jeder B-Lymphozyten-Klon ist für ein spezifisches Antigen zuständig. Es wird angenommen, dass das humane Immunsystem primär über ein Rezeptorrepertoire von ca. 10^9 verschiedenen Antigenrezeptoren verfügt, die mit dem jeweiligen Antigen reagieren und eine Immunantwort einleiten. Die Bindung eines Antigens an die B-Zelle ist das Signal, welches die Zellproliferation und Differenzierung verursacht. Während dieser letzten Differenzierungsstufe entwickeln sich die B-Zellen einerseits in Plasmazellen, die zur Sekretion großer Mengen an Immunglobulinen befähigt sind, jedoch keine Oberflächen-Ig-Rezeptoren und MHC-Klasse II-Moleküle tragen. Sie besitzen nach ihrer endgültigen Differenzierung nur eine begrenzte Lebensdauer von etwa vier Wochen.

Andererseits entwickeln sich aus den aktivierten B-Lymphozyten langlebige Gedächtniszellen, die über mehrere Jahre im Körper existieren und zu einem stetigen Immunitätschutz beitragen. Diese Memory-B-Zellen können bei der

primären Antwort keine Antikörper sezernieren, jedoch kommt es bei einem späteren Auftreten desselben spezifischen Antigens zu einer sekundären Aktivierung mit einer schnellern und verstärkten Antikörperbildung.

Das Oberflächenantigen CD19 wird von allen B-Lymphozyten exprimiert, so dass monoklonale Antikörper gegen CD19 bei der durchflußzytometrischen Identifikation als B-Zell-Marker dienen. Außerdem können auf B-Lymphozyten Oberflächenmarker wie CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD45 und HLA-DR nachgewiesen werden.

Das Antigen CD25 wird von aktivierten B-Zellen exprimiert. Als α -Kette ist es ein Baustein des IL-2-Rezeptors, dessen Synthese nach spezifischem Antigenkontakt induziert wird. Erst die Verbindung der α -Kette mit den beiden β - und γ -Ketten führt zu einer erhöhten IL-2-Affinität des Rezeptors. Das Antigen CD86, sowie CD80 und CD40, ist ein auf aktivierten B-Zellen exprimiertes kostimulatorisches Molekül, das ein Aktivierungssignal an T-Zellen geben kann (Steinman et al., 1993).

1.5.1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten reifen im Thymus heran, wo sie ihre Antigen-spezifität und die Fähigkeit zur MHC-Erkennung erhalten. Die Antigenerkennung der T-Zellen erfolgt über den T-Zellrezeptor (Clevers et al., 1988). Jedoch funktioniert dies nur dann, wenn die Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (APC) in Verbindung mit MHC-Molekülen angeboten werden.

Die Aktivierung naiver T-Zellen findet an einer Kontaktstelle zwischen APC und T-Zelle statt, die als „immunologische Synapse“ bezeichnet wird (Bromley et al., 2001; Delon and Germain, 2000). Die immunologische Synapse ist ein komplexer Bereich, bestehend aus vielen kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen und dem T-Zellrezeptor-MHC-Komplex, der sich im Verlauf der Interaktion verändert.

Nach Antigenkontakt durchlaufen die T-Lymphozyten verschiedene Stufen der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung und lassen sich in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterteilen. Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich in der Expression ihrer Membranproteine.

Die T-Helferzellen zeichnen sich durch das Membranmolekül CD4 aus. Sie erkennen Antigene, die von MHC-Klasse II-Moleküle der APCs (dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und einige wenige andere Zelltypen) präsentiert werden. Ihre Fähigkeit liegt in der Sekretion von Cytokinen (z. B. IL-6, IL-10 und GM-CSF), welche den Aktivitätszustand anderer Immunzellen beeinflussen. Entsprechend der Cytokinproduktion werden die T-Helferzellen in zwei weitere Gruppen unterteilt. Die Th1-Zellen sezernieren vornehmlich IL-2, IFN- γ und TNF- α/β und fördern die zelluläre Immunität durch Aktivierung

zytotoxischer und phagozytierender Zelle, wie zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Cytokine dienen der Abwehr von Pathogenen, indem sie die Bildung von IgE fördern und eosinophile und basophile Granulozyten und Mastzellen aktivieren. Th2-Zellen dienen auch als Mediatoren für allergische Reaktionen und führen zur Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten (Mosmann and Fong, 1989; Chang et al., 1990). Ferner können auch Th1- und Th2-Zellen die Produktion von pro- und anti-inflammatorische Cytokine durch direkten Zellkontakt mit Monozyten auslösen (Chizzolini et al., 1997).

Die zytotoxischen T-Zellen exprimieren den Zellmarker CD8 und erkennen Fremdantigene nur in Verbindung mit MHC-Klasse I-Proteinen, welche auf allen kernhaltigen Zellen existieren. Die wichtigste Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten ist die Lyse antigentragender Zielzellen; sie eliminieren virusinfizierte und maligne entartete Zellen. Eine weitere Funktion ist die Produktion von Cytokinen.

Die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen regulieren die Funktion anderer Immunzellen, kontrollieren sich aber auch gegenseitig in ihrer Funktion.

1.5.2 Monozyten

Monozyten sind weiße Blutzellen mit einem großen, unsegmentierten Kern. Sie entstehen im Knochenmark aus myeloiden Progenitorzellen. Im Blut zirkulieren die Monozyten ca. drei Tage, danach wandern sie in verschiedene Organgewebe ein und differenzieren dort zu spezialisierten Phagozyten (Makrophagen). Während einer Entzündungsreaktion locken neu gebildete Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen lokaler Blutgefäße sowie Chemokine viele zirkulierende Leukozyten (Monozyten und Neutrophile) zum Infektionsort.

Im Hinblick auf spezifische Oberflächenmoleküle lassen sich Monozyten von anderen Blutzellen abgrenzen und man kann verschiedene Reifungsstadien unterscheiden. Der LPS-Rezeptor CD14 ist der Oberflächenmarker, der von allen Monozyten exprimiert wird, nur eine Subpopulation reifer Zellen besitzen dagegen das Oberflächenmolekül CD16 (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 1993). Monozyten und Makrophagen können Zellen, Bakterien und andere Pathogene phagozytieren und die aufgenommenen Fremdantigene anderen Immunzellen präsentieren. Die Erkennung potentiell schädlicher Substanzen wird durch Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline und Komplementkomponenten erleichtert. Ferner exprimieren Monozyten die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 (Ranger et al., 1996). Zudem sezernieren sie zytotoxische Enzyme und Cytokine (z. B. IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , PGE₂), die weitere Immunzellen aktivieren und eine spezifische Immunreaktion hervorrufen.

1.5.3 Cytokine –Steuerfaktoren des Kommunikationssystems

Cytokine sind definitionsgemäß Botenstoffe, die von Zellen abgegeben werden und das Verhalten anderer Zellen beeinflussen. Sie werden hauptsächlich von Immunzellen produziert und können, als ein Mechanismus der Zellkommunikation, lokal oder systemisch über einen parakrinen, endokrinen oder autokrinen Weg agieren. Bislang sind etwa 50 Cytokine identifiziert, wobei jedes über multiple zelluläre Effekte verfügt (Barnes, 1994). Sie beeinflussen das Überleben, die Proliferation, Differenzierung, Migration und weitere verschiedene Mechanismen von Leukozyten, wodurch sie die Dauer und Stärke einer Immunantwort regulieren. So kann ein Cytokin pro-inflammatorisch wirken, oder Entzündungsprozesse hemmen.

Im Folgenden werden die Cytokine IL-10, TNF- α und GM-CSF genauer besprochen, da sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

1.5.3.1 Interleukin-10

IL-10 ist ein 35 kDa großes Protein, das als nicht glycosyliertes Homodimer im menschlichen Körper vorkommt.

Ursprünglich wurde IL-10 als ein Produkt von Th2-Lymphozyten entdeckt, das die Cytokinproduktion von Th1-Zellen hemmt. Zusätzlich produzieren auch Th1-Lymphozyten (Del Prete et al., 1993), Monozyten (de Waal Malefyt et al., 1991), Makrophagen und mit Epstein-Barr-Virus infizierte B-Lymphozyten (Burdin et al., 1993) das Interleukin-10. Die Sekretion erfolgt im Vergleich zu anderen Cytokinen verzögert, das Maximum wird erst nach 24 – 48 h erreicht. Nach Stimulation mit LPS, PGE₂ und TNF- α , aber auch durch Parasiten, Bakterien, HIV und andere Viren setzen Monozyten und B-Zellen IL-10 frei. Die stark suppressive Wirkung von IL-10 wird dadurch verursacht, dass die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen, wie IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α und GM-CSF, inhibiert wird (Fiorentino et al., 1991), gleichzeitig wird der anti-inflammatorisch wirkende IL-1-Rezeptor-Antagonist vermehrt gebildet (Arend, 1993).

Wie bei anderen Th2-Cytokinen, wird auch durch IL-10 die Proliferation und Aktivierung von B-Zellen unterstützt (Rousset et al., 1992). IL-10 inhibiert nicht nur über die Änderung der Monozytenfunktion die T-Zell-Proliferation, sondern kann auch direkt, durch eine Verminderung der IL-2-Produktion, die Proliferation von CD4⁺-T-Lymphozyten hemmen (de Waal Malefyt et al., 1991). Daneben inhibiert IL-10 die Antigenpräsentation über MHC-Klasse II-Moleküle und die Freisetzung von zytotoxischen NO-Radikalen (Gazzinelli et al., 1992).

1.5.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α)

Humanes TNF- α ist ein 17 kDa großes, nicht glycosyliertes Protein. TNF- α wird vor allem von Monozyten und Makrophagen, in geringerem Maße auch von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Mastzellen produziert. Für TNF- α sind zwei unterschiedliche Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) bekannt, die von den meisten Zellen, außer von Erythrozyten und ruhenden T-Lymphozyten, exprimiert werden (Stewart and Marsden, 1995).

TNF- α wirkt als pro-inflammatorisches Cytokin und ist ein wesentlicher Mediator bei der Abwehr gegen gramnegative Bakterien und spielt möglicherweise auch bei der Antwort auf andere infektiöse Organismen eine Rolle. Als Reaktion auf eine Infektion wird TNF- α von Phagozyten sezerniert und wirkt zusammen mit TNF- β und IFN- γ bei der cytokinvermittelten Eliminierung der Zielzellen. Die Cytokin- und Chemokin-Produktion mononukleärer Phagozyten wird durch TNF- α stimuliert.

Durch geringe Konzentrationen an TNF- α werden Endothelzellen aktiviert und die Permeabilität der Gefäßwände erhöht, was zu einem erhöhten Einstrom von IgG, Komplementkomponenten und Immunzellen ins Gewebe führt. Ferner verändert TNF- α die Oberflächeneigenschaften der Endothelzellen, so dass vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden und sich zunächst Neutrophile, später Monozyten und Lymphozyten anlagern.

Höhere Konzentrationen an TNF- α können bereits systemische Wirkungen zeigen. B- und T-Lymphozyten werden stimuliert, Fieber wird induziert, Metaboliten werden mobilisiert und es kann zu einem septischen Schock kommen. Erhöhte TNF- α Konzentrationen können bei schweren Infektionen, Meningitis, Sepsis, HIV-Infektionen und Transplantat-Abstoßungsreaktionen im Serum nachgewiesen werden (Mintz et al., 1989; Kita et al., 1996).

1.5.3.3 Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)

Das Cytokin GM-CSF ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 22 - 28 kDa und gehört, wie IL-3 und IL-5, zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Es wird von Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Th1- und in geringerem Maße von Th2-Lymphozyten sezerniert (Baldwin, 1992).

GM-CSF ist für die Entwicklung von dendritischen Zellen und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen essentiell (Romani et al., 1994). Die Hauptfunktion besteht in der Aktivierung pro-inflammatorischer Zellen, wie neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie mononukleäre Phagozyten (Arm and Lee, 1992). Außerdem bewirkt GM-CSF eine Zunahme der Chemotaxis (Warringa et al., 1991) und eine Steigerung der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität gegen Tumorzellen oder Pathogene (Lopez

et al., 1986). Ferner beeinflusst GM-CSF die Expression verschiedener Oberflächenantigene, wie HLA-DR, CD4 und des IL-2-Rezeptors (Hansel et al., 1992; Riedel et al., 1990).

2 Zielsetzung der Arbeit

Mikropartikel werden nicht nur durch Stimulation oder Aktivierung einer Zelle oder bei Apoptose freigesetzt, sondern auch unter physiologischen Voraussetzungen. In den letzten Jahren ist das Interesse an der Charakterisierung und der Funktion von Mikropartikeln, die nach Zellstimulation oder nach Eintreten des programmierten Zelltods entstehen, beachtlich angestiegen. Der Wissensstand über Mikropartikel hingegen, die ohne besondere Stimuli von Zellen abgeschnürt werden, ist noch sehr gering.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Mikropartikel, die unter normalen Bedingungen freigesetzt werden, genauer charakterisiert werden, der Transfer auf andere Zellen auf molekularer Ebene analysiert und der resultierende Effekt auf die Akzeptorzellen untersucht werden.

Zielsetzung:

- I. Charakterisierung der Mikropartikel und Analyse des Mechanismus des Mikropartikel-Transfers**
- II. Untersuchung des Einflusses von transferierten Mikropartikeln auf Akzeptorzellfunktionen**

Für den ersten Teil der Arbeit wurden Mikropartikel aus Donorzellen isoliert. Analysen zur Struktur der Mikropartikel-Oberfläche sollten Aufschluss über die Phospholipid-Zusammensetzung und die Expression von Membranproteinen und -Rezeptoren geben. Im Anschluss daran sollten verschiedene Zelltypen auf Mikropartikel-Aufnahme untersucht werden und die beim Transfer involvierten Rezeptoren beschrieben werden. Als Akzeptorzellen wurden PBMCs (periphere mononukleäre Zellen) und endotheliale Zellen eingesetzt. Zur Charakterisierung des Transfers sollten verschiedene Faktoren, die bei Membranfusionen eine wesentliche Rolle spielen im Transfermodell auf Verminderung oder Verstärkung der Vesikelaufnahme untersucht werden. Des Weiteren sollten durch Inhibitionsversuche Membranproteine identifiziert werden, die zu einer Aufnahme von Membranpartikel durch Akzeptorzellen beitragen.

Weiterhin werden Transfer-Experimente in Anwesenheit von Serum analysiert, da Proteine, wie Antikörper oder Komplementkomponenten, die im Serum permanent vorhanden sind, Membranpartikel opsonieren und den Mechanismus der Aufnahme durch Zielzellen beeinflussen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden in wie weit der Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten und B-Lymphozyten die funktionellen Eigenschaften dieser Zellen verändert. Dazu sollten bei Monozyten die LPS induzierte Cytokinproduktion untersucht werden und bei B-Zellen Aktivierungsmarker mittels Durchflußzytometrie analysiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

3.1.1 Allgemeine Materialien

Annexin V-Biotin	Pharmingen, Heidelberg
Annexin V-FITC	Pharmingen, Heidelberg
Annexin V (rekombinant)	Pharmingen, Heidelberg
Annexin V Bindungspuffer (10x)	Pharmingen, Heidelberg
Botulinum Toxin A	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bovines Serum Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chondroitinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Cytochalasin B	Sigma, Deisenhofen
Cytochalasin D	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol (100% p.A.)	Merck, Darmstadt
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Heparan sulfat	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lanthanchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid	Sigma, Deisenhofen
MACS B-cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MicroBeads CD14	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MicroBeads CD19	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

MACS Pan T-cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MEM mit Glutamax	Life Technologies, Schottland
Mowiol	Calbiochem, La Jolla, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat MEM 100 MM	Life Technologies, Schottland
N-ethylmaleimid (NEM)	Sigma, München
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA Laboratories, Wien
PMA (phorbol-12-myristate 13-Acetat)	Sigma, München
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Wien
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Quecksilberchlorid	Sigma, München
RPMI 1640 mit Glutamax	Life Technologies, Schottland
Tetanus Toxin (<i>Clostridium tetani</i>)	Calbiochem, La Jolla, USA
Tris	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween 20	Fluka, Buchs, Switzerland
Vybrant CM-Dil cell labeling solution	Molecular Probes, Oregon, USA
Vybrant Dil cell labeling solution	Molecular Probes, Oregon, USA
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Y-27632 (ROCK inhibitor)	Calbiochem, La Jolla, USA
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.2 Komplement-Reagenzien

Complement Serum Standard (human)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
C1q-depleted Serum (human)	Calbiochem, La Jolla, USA
C2-depleted Serum (human)	Calbiochem, La Jolla, USA
C3-depleted Serum (human)	Calbiochem, La Jolla, USA
Complement C1q (human)	Calbiochem, La Jolla, USA
Complement C2 (human)	Calbiochem, La Jolla, USA
Complement C3 (human)	Calbiochem, La Jolla, USA

3.1.3 ELISA-Reagenzien

DuoSet ELISA Development Kit von R&D Systems, Mineapolis, USA:

IL-10 (human)

GM-CSF (human)

TNF- α (human)

TMB Substrat der Firma Pharmingen, Heidelberg

3.2 Lösungen und Puffer

10 fach PBS	2,7 M NaCl
	65 mM Na ₂ HPO ₄
	15 mM KH ₂ PO ₄
	27 mM KCl
	in H ₂ O
	pH 7,4
MACS-Puffer	1 fach PBS, pH 7,2
	0,5 % BSA
	2 mM EDTA

PBS-Tween	1 fach PBS, pH 7,2 0,05 % Tween 20
10 fach Annexin V Bindungs-Puffer	0,1 M Hepes/NaOH, pH 7,4 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂
Coating Buffer	0,12 M NaH ₂ PO ₄ 66 mM Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O pH 6,5
Block Buffer	1 fach PBS 1 % BSA 5 % Sucrose 0,05 % NaN ₃

3.3 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden für die FACS-Analysen und Transfer-Versuche die in Tabelle 3.1 und Tabelle 4.2 aufgeführten Antikörper verwendet.

Tabelle 3.1: *Verwendete mono- und polyklonale Antikörper*

Antikörperklon	Isotyp	Hersteller
AnnexinV (RUU-WAC2A)	IgG1 (Mouse)	Monosan, Uden, NL
AnnexinV (UMC01, früher RUU-WAC2A)	IgG1 (Mouse)	Monosan, Uden, NL
AnnexinV (VAA-33)	IgG2a (Mouse)	Alexis, Grünberg
CD11b (Bear1)	IgG1 (Mouse)	BeckmanCoulter
CD11c (BU15)	IgG1 (Mouse)	BeckmanCoulter

Antikörperklon	Isotyp	Hersteller
CD14 (MEM15)	IgG1 (Mouse)	Monosan, Uden, NL
CD14 (MEM18)	IgG1 (Mouse)	Monosan, Uden, NL
CD14 (RMO52)-APC	IgG2a (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD14 (RMO52)-FITC	IgG2a (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD19-FITC (J4.119)	IgG1 (Mouse)	BeckmanCoulter
CD21 (FE8)	IgG1 (Mouse)	Upstate, New York
CD25-PE (M-A251)	IgG1 (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD29 (4B4)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD3 (UCHT1)	IgG1 (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD35 (J3D3)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD36 (CB38)	IgM (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD8-Cy5 (b9.11)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD3-FITC (UCHT1)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD4-APC (13B8.2)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD4-FITC (13B8.2)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD59 (YTH53.1)	IgG2b (Rat)	Biozol, Eching
CD59-FITC (YTH53.1)	IgG2b (Rat)	Serotec, Oxford, UK
CD63 (CLB-gran12)	IgG1 (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD81 (JS64)	IgG2a (Mouse)	Coulter Corp., Miami, USA
CD82 (50F11)	IgG1 (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD86-PE (2331)	IgG1 (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
CD9 (BU16)	IgG2a (Mouse)	Biodesign, Saco, USA
CD9 (K41)	IgG1 (Mouse)	PD Dr. J. Schneider-Schaulies, Universität Würzburg
EpCAM (3B10C9)	IgG1 (Mouse)	Micromet, München
iC3b	IgG2b (Mouse)	Quidel Corp. San Diego, USA
IgG1	(Mouse)	Sigma, München
IgM (G20-127)	(Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
IgG F0313 (FITC)	(Mouse)	Dako, Hamburg
IgG R0439 (PE)	(Mouse)	Dako, Hamburg

Antikörperklon	Isotyp	Hersteller
MC-1 (Epimorphin)	IgG1 (Mouse)	Sumitomo, Yokohama, Japan
MHC-class II (HLA-DR-PE)	IgG1 (Mouse)	Pharmingen, Heidelberg
PS (PSR-45)	IgG1 (Mouse)	Sigma, München
PSR (mAb 217)	IgM (Mouse)	V. Fadok, National Jewish Medical and Research Center, Denver, USA
VAMP I (10.1)	IgG1 (Mouse)	Synaptic Systems, Göttingen
VAMP II (CL69.1)	IgG1 (Mouse)	Synaptic Systems, Göttingen

3.4 Eukaryontische Zelllinien

Kato-Zelllinie (humane Magenkarzinomlinie)

ATCC, Rockville, Maryland, USA

stabil transfizierte CHO-Zelllinie (human CCR5)

ATCC, Rockville, Maryland, USA

Endothelzellen HL MEC und HSp MEC

3.5 Kultur- und Einfriermedien für eukaryontische Zellen

CHO-Vollmedium

MEM Alpha Medium mit L-Glutamin, ohne
Nukleoside

10 % dekomplementiertes FCS

100 U/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

Kato- Kulturmedium	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin 10 % Hitze-inaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium	jeweiliges Kulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 30 % und 10 % DMSO

3.6 Geräte

Minifuge T	Hereaus, Hanau
Diavert Mikroskop	Leitz; Wetzlar
FACS Calibur 4CA	BD Biosciences, Heidelberg
Megafuge 1,0 R	Hereaus, Hanau
Steril Gard Hood	Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz-Mikroskop DM RBE	Leica, Bensheim
DC 300 F Kamera	Leica, Bensheim
Biofuge 15	Hereaus, Hanau
pH-Meter Multi Cal	WTW
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
ELISA-Reader GENios Plus	Tecan, Crailsheim

3.7 Verbrauchsmaterial

Polystyrol-Kulturflaschen	Nunc, Naperville, USA Greiner Bio One, München
MACS MS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
S-Monovette K3E (EDTA)	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette Z-Gel (Serum)	Sarstedt, Nümbrecht

Amicon Ultra Filter	Millipore Cororation, Bedford, USA
Objektträger	Menzel-Gläser GmbH, Braunschweig
Centricon YM 3 Filter	Millipore Cororation, Bedford, USA
Deckgläser 12 mm Ø	Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen
24well Microplatten	Greiner Bio One, München
Rundboden 96well (FACS)	Greiner Bio One, München
96well Microplatten	Greiner Bio One, München
MaxiSorp ELISA Platten (96well)	Nunc, Naperville, USA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Standardmethoden.

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, wurden in einer Sicherheitswerkbank (SterilGardHood, Baker Company) durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden als Adhäsionskulturen oder Suspensionskulturen in Polystyrol-Flaschen (Nunc, Greiner) kultiviert. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken (Heraeus) bei 37°C, 96 % relativer Feuchte und 5 % CO₂ inkubiert.

4.1.2 Passagieren von Zellen

Zellkulturmedien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert.

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen alle 2-4 Tage je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt.

Die Zellen wurden zum Ablösen von der Kulturflasche mit PBS, 1,5 mM EDTA behandelt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen, um das im Medium enthaltene FCS zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von PBS/EDTA und 2-10 min Inkubation bei 37°C von der Kulturflasche abgelöst. Durch Zentrifugation (5 min, 200 x g, MinifugeT, Heraeus) wurden die Zellen pelletiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurden die Zellen in eine frische Kulturflasche mit entsprechendem Medium gegeben.

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in Suspension gebracht (siehe 4.1.2). Durch Zentrifugation für 5 min bei 200 x g (MinifugeT, Heraeus) wurden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl FCS-haltigem Medium aufgenommen und mit 500 µl Einfriermedium (20 % FCS-freies Medium, 20 % DMSO (Sigma), 60 % FCS) zur Vermeidung von Eiskristallen versetzt. Diese Zellsuspension wurde in Nunc Cryovials (2 ml) pipettiert und in

Einfrierboxen, die mit Isopropanol gefüllt sind, für 3 Tage bei -80°C , danach in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen von Zellen wurden die gefrorenen Zellaliquots aus dem Stickstofftank entnommen und in einem 37°C Wasserbad auf 4°C erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit 20 ml Vollmedium versetzt, um zytotoxisches DMSO zu verdünnen. Durch Zentrifugation von 3 min bei $200 \times g$ (MinifugeT, Heraeus) wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in Vollmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt, so dass eine Dichte von 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/Flasche nicht unterschritten wurde.

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl vitaler Zellen

Aus einer Einzelzellsuspension wurde ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau-Lösung gemischt. Lebende, d.h. ungefärbte Zellen, wurden anschließend in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergab sich aus der Summe der Zellzahl in 16 Kleinquadraten, dem Kammervolumenfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor.

4.2 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Um große Mengen peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Blut zu gewinnen wurden „Buffy Coats“ oder Vollblut gesunder Spender verwendet.

Die „Buffy Coats“ wurden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) versetzt, wohingegen das heparinisierte Vollblut unverdünnt eingesetzt wurde. In 50 ml Falcon-Röhrchen wurde 15 ml auf Raumtemperatur erwärmte Ficoll Separating Solution vorgelegt, welche mit 25 ml Blut vorsichtig überschichtet wurde. Die Falcon-Röhrchen wurden für 25 min bei $400 \times g$ (Heraeus) ohne Bremse, damit der Dichtegradient nicht zerstört wird, zentrifugiert. Durch die Dichte des Ficolls (1.077 g/ml) sedimentieren die Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte, darüber findet sich die Ficoll Separating Solution und dann die wässrige Phase aus Kochsalzlösung und Plasma. In der Interphase zwischen Ficoll und wässriger Phase bildet sich eine dünne Schicht aus mononukleären Zellen, welche vorsichtig abpipettiert und mit der gleichen Menge RPMI / 10% FCS verdünnt wurde. Es folgten zwei Waschschriffe mit RPMI/10% FCS bei $400 \times g$ für 7 min. Bei einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei $120 \times g$ werden die Thrombozyten entfernt. Das entstandene Pellet wurde in Vollmedium verdünnt und mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in Kryoröhrchen mit einer Konzentration von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml eingefroren (siehe 4.1.3). Für den weiteren Gebrauch in

funktionellen Versuchen wurden die PBMCs aufgetaut und für 24 h mit Vollmedium in 24-well-Platten in Kultur genommen.

4.3 Durchflußzytometrie

4.3.1 Allgemeines

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um eine Technik zur Fluoreszenz-abhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen in Suspension.

In der vorliegenden Arbeit wird die Durchflußzytometrie mehrfach als FACS angegeben. Diese Bezeichnung ist technisch gesehen nicht der korrekte Ausdruck. FACS steht für „fluorescence-activated cell sorter“. Das Messprinzip beider Methoden ist das gleiche. Während bei der Durchflußzytometrie nur die Zelleigenschaften analysiert und gemessen werden, können bei einem FACS diese Zellen anhand ihrer Eigenschaften sortiert und wiedergewonnen werden.

Das Durchflußzytometer besteht aus dem System zur Probeneingabe, dem optischen System mit Lichtquellen und Detektorsystem sowie einer Datenverarbeitungseinheit. Die Grundlage des Funktionsprinzips beruht auf der simultanen Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellsuspensionen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt sind. Die Bestimmung von Größe und Granularität der Zelle über die Lichtstreuung und die Untersuchung von Zelleigenschaften durch Assoziation von Fluoreszenzfarbstoffen ist parallel ausführbar.

Die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellsuspension wird aus dem Proberöhrchen über einer Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit (FACS-Flow, BD) werden die Zellen beschleunigt (bis zu 7 m/sec), vereinzelt und zum Analysepunkt transportiert. Dieses Prinzip wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet (siehe Abbildung 4.1).

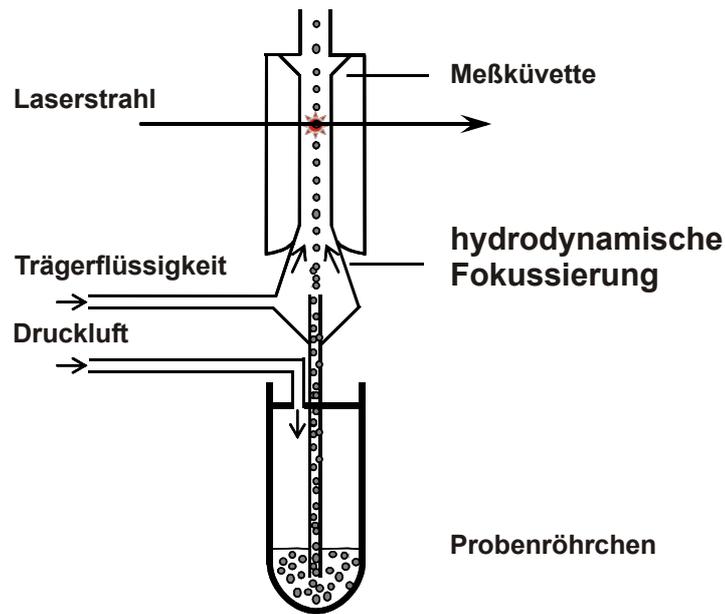


Abbildung 4.1: Hydrodynamische Fokussierung

Die folgende Messung der Lichtstreuung wird durch die Richtungsänderung des anregenden Lichtes ermöglicht, verursacht durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$).

Abhängig von verschiedenen physikalischen Zelleigenschaften, wie Querschnittsfläche, Membranstruktur, Refraktionsindex und intrazellulären Bestandteilen, wird das Licht, das auf die Zelle trifft, unterschiedlich stark gestreut.

Hierbei unterscheidet das Gerät zwischen:

1. Vorwärtsstreulicht (engl. *forward light scatter*, FSC) entlang der Richtung des einfallenden Lichtes (Kleinwinkelbereich von $0 - 10^\circ$) korreliert mit dem Zellquerschnitt, welches ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zelle darstellt.
2. Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward light scatter*, SSC), welches sich in rechtwinkliger Abweichung ausbreitet und dem Refraktionsindex entspricht. Es veranschaulicht die intrazelluläre Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle.

So lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 4.2) und eine separate Betrachtung von z. B. Monozyten oder Lymphozyten wird durch spezifische Eingrenzung (*gating*) ermöglicht. Dadurch kann man bei der Auswertung eine Vorauswahl der zu analysierenden Zellen treffen.

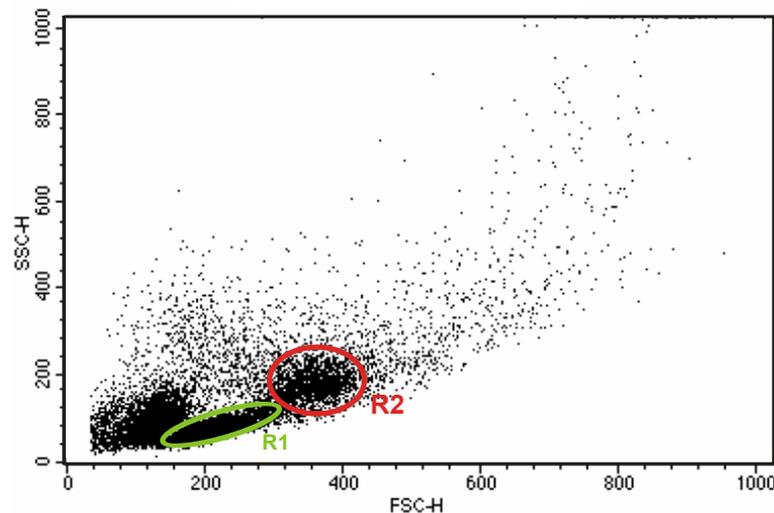


Abbildung 4.2: FACS-Analyse von PBMCs. Anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC) lassen sich verschiedene Zellpopulationen eingrenzen (*gaten*). Region „R1“ umfasst die Lymphozyten, „R2“ stellt die Monozyten dar.

Die zeitlich parallel ablaufende Messung der Fluoreszenz beruht auf der Absorption von Lichtenergie über einen für fluoreszierende Verbindung charakteristischen Wellenlängenbereich durch das Anheben von Elektronen auf ein höheres Energieniveau und der darauf folgenden Photonenemission durch das Zurückfallen auf das energetische Grundniveau. Das Problem der Autofluoreszenz der Zellsuspension wird mit Hilfe der Messung einer „negativen Kontrolle“ (mit Kontrollantikörpern versetzte ungefärbte Probe) kompensiert. Mit Hilfe der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ist eine Korrelation mehrerer Zelleigenschaften möglich.

Tabelle 4.1: Extinktions- und Emissionswellenlängen für Fluoreszenzfarbstoffe bei der Durchflußzytometrie mit FACScalibur

Fluorochrome	Laser (nm)	Emission (nm)
Fluorescein (FITC)	488	525
R-Phycoerythrin (R-PE)	488	575
Tricolor (TC,Cy 5.5)	488	694
Allophycocyanin (APC)	633, 635	660

Die optischen Signale werden mittels Photomultiplier und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt, die über die entsprechende Software (CellQuest, BD Biosciences, Heidelberg) graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Für die Messung der Proben wurde eine geeignete Geräteeinstellung (Instrument Setting) verwendet. Diese legt den Grad der Fluoreszenzsignalverstärkung (Amplifikation), der Messschwelle (Treshhold) und der Kompensationseinstellung fest. Diese ist notwendig, um die spektrale Überlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Dabei wird der jeweils in das angrenzende Spektrum reichende Farbanteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert.

4.3.2 Fluoreszenzfärbung

4.3.2.1 Direktfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Für die Direktfärbung einer Zellsuspension (PBMCs) wurde ein Gemisch aus unterschiedlichen Antikörpern, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Antikörper-Mix für 30 min auf Eis inkubiert. Die Inkubation bei einer Temperatur zwischen 4 – 12°C verhindert eine eventuelle Aktivierung der Zellen durch die Antikörper und führt zu einem eingeschränkten Turnover zwischen Bindung und Ablösung der zugesetzten Antikörper vom entsprechenden Antigen. Die Zellsuspension wurde anschließend dreimal mit PBS gewaschen und gemessen. Mittels dieser Färbung lassen sich Zellpopulationen und deren Subpopulationen im FACS definieren. In Tabelle 4.2 sind die in der vorliegenden Arbeit häufig verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und Zielstruktur aufgeführt.

Tabelle 4.2: Direkt markierte Antikörper für die Durchflußzytometrie

Antigen	Farbstoff	Verdünnung	Zielstruktur
CD3	FITC	1 : 75	T-Zellen
CD4	APC	1 : 100	T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen
CD8	Cy5.5	1 : 300	Cytotoxische T-Zellen
CD14	APC	1 : 75	Monozyten, LPS-Rezeptor, Granulozyten,
CD19	FITC	1 : 75	B-Zellen

4.3.2.2 Direktfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Als Mikropartikel sezernierende Donorzellen wurden für die Transfer-Experimente entweder CHO-Zellen, die mit humanem CCR5 stabil transfiziert sind, oder Kato-Zellen (humane Magenkarzinom-Zellen) verwendet. Um den Transfer in FACS-Analysen sichtbar zu machen wurden diese Donorzellen mit Carbocyanin-Membranfarbstoffen gefärbt. Die lipophilen Membranfarbstoffe Vybrant Dil, DiO und DiD sind stark fluoreszierend und photostabil, wenn sie in Membranen inkorporiert worden sind. Ein Vorteil dieser Farbstoffe ist ihre schwache Toxizität und die Möglichkeit sie direkt in normalem Zellkulturmedium einzusetzen. Die Inkubation mit der Cell-labeling-solution Dil erfolgte für 15 min bei 37°C. Die Zellen wurden vor der weiteren Verwendung dreimal mit 10 ml Medium gewaschen.

4.3.2.3 Sekundärfärbung

Bei der indirekten Färbung wird der spezifische monoklonale Antikörper von einem fluorochromierten polyklonalen Sekundärantikörper detektiert, was eine höhere Empfindlichkeit, aber auch eine Verstärkung des Hintergrundes zur Folge haben kann, da die Spezifität der Färbung abnimmt. Prinzipiell wird hierbei ein nicht-markierter Antikörper durch einen Biotin- oder fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörper gekennzeichnet. Ungebundener Antikörper wurde zwischen den einzelnen Inkubationsschritten durch drei Waschschriffe mit PBS entfernt. Zur Kontrolle einer unspezifischen Bindung ist die Färbung einer Probe mit dem jeweiligen Isotypkontrollantikörper erforderlich. Diese ist zur Überprüfung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers als Negativkontrolle nötig. Folgt auf diese indirekte Färbung eine Direktfärbung von weiteren Oberflächenmolekülen, so müssen die freien Bindungsstellen der bivalenten Sekundärantikörper geblockt werden, um eine unspezifische Bindung der direkt markierten Antikörper zu verhindern. Die Proben wurden dazu für 10 min bei Raumtemperatur mit Ratten- bzw. Mausserum in einer 1:10 Verdünnung inkubiert und vor der Direktfärbung nicht gewaschen.

4.3.2.4 Erythrozytenlyse

Bei Vollblutproben, die einen hohen Anteil an Erythrozyten enthalten, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Die Eliminierung der Erythrozyten erfolgte durch die chemoosmotische Lyse. Diese bestand aus der Zugabe einer eiskalten, hypotonen 0,2%igen NaCl-Lösung für 10 sec und einer anschließenden Zugabe einer 1,6%igen NaCl-Lösung gleichen Volumens zur Herstellung isotoner Bedingungen. Die lysierten Erythrozyten wurden nach einer Zentrifugation für 10 min bei 750 x g abgesaugt. Eine weitere Möglichkeit zur Entfernung der Erythrozyten bot die Lyselösung der Firma Beckton Dickinson (FACSLysis). Dabei werden die Erythrozyten laut Herstellerangaben ebenfalls durch milde hypotonische Bedingungen lysiert. Allerdings ist die Lösung mit

< 15% Formaldehyd versetzt, wodurch die Färbung und die Zellen fixiert werden. Durch die Lyse wird die FACS-Aufnahme der zu untersuchenden Zellen optimiert, da weniger irrelevante Einzelereignisse aufgenommen werden.

4.4 Transfer von Mikropartikeln

4.4.1 Bildung von Mikropartikeln

Für die Freisetzung von Mikropartikeln standen hCCR5 CHO-Zellen oder Kato-Zellen zur Verfügung, die wie in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben mit dem Membranfarbstoff Dil markiert oder unmarkiert waren. 4×10^7 Zellen wurden nach der Fluoreszenzfärbung in 20 ml entsprechendem Medium resuspendiert und für 90 min bei 37°C und 96 % relativer Feuchte in 5 % CO₂ inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 200 x g (MinifugeT, Heraeus) um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Für die Gewinnung der Mikropartikel wurde der Überstand anschließend für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die pelletierten Mikropartikel wurden zur weiteren Verwendung in Medium resuspendiert.

4.4.2 Transfer-Experimente

Die Aufnahme von Mikropartikeln durch Akzeptorzellen wurde teilweise durch Koinkubation von isolierten Mikropartikeln (4.4.1) mit den Akzeptorzellen erzielt, es wurden aber auch die Dil-markierten Donorzellen direkt für die Koinkubation verwendet. Um die Einflüsse verschiedener Reagenzien und Antikörper auf den Transfer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Versuchsansätze ausgeführt. Zum einen wurden in einigen Ansätzen die Donor- und Akzeptorzellen mit den Reagenzien oder Antikörpern inkubiert. Zum anderen wurden entweder die Donor- oder die Akzeptorzellen behandelt. Der Transfer auf die Akzeptorzellen wurde in einem Volumen von 100 µl in 96-well-Platten durchgeführt. Für diverse Experimente wurden die behandelten Zellen zuvor mehrmals mit PBS oder Kulturmedium gewaschen. Die Waschschrte wurden in den 96-well-Platten ausgeführt. Dazu wurden die Zellen bei 200 x g pelletiert und mit 200 µl der entsprechenden Waschlösung (PBS bzw. Medium) resuspendiert. Für andere Ansätze, bei denen die Reagenzien oder Antikörpern auch während des Transfers präsent sein sollten, wurden die Zellen nicht gewaschen und direkt zusammen koinkubiert. Diese Koinkubation fand bei 37°C und 96 % relativer Feuchte in 5 % CO₂ für 90 min statt und wurde während dieser Zeit mehrmals geschüttelt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen. Um die Transfer-Experimente im FACS zu analysieren wurden die Monozyten und Lymphozyten wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben fluoreszenzmarkiert.

4.5 Gewinnung spezifischer Zellen durch immunomagnetische Separierung

Die magnetische Zellsortierung (MACS, *magnetic cell separation*) basiert auf der Markierung von Zellen mit Hilfe von superparamagnetischen Mikropartikeln (MicroBeads) mit einem Durchmesser von etwa 100 nm, die an Antikörper gekoppelt sind. Dieses magnetische Zellseparationssystem besteht aus einer mit ferromagnetischer Stahlwolle gefüllten Säule, die in einen externen und permanenten Magneten inseriert wird. Das so erzeugte „high-gradient magnetic field“ ermöglicht die Bindung der markierten Zellen an die Stahlwollefäsern, deren vergrößerte Oberfläche nahezu alle markierten Zellen bindet und diese dadurch aus der heterogenen Zellsuspension aussortiert. Dieses System eignet sich sowohl für eine Negativ- als auch eine Positivselektion von Zellen. Durch dieses Isolationsverfahren kann eine Reinheit von bis zu 98 % erreicht werden.

4.5.1 Positiv-Selektion: Isolation von CD14⁺- und CD19⁺-Zellen

Zur Separation von je 10^7 Zellen wurden PBMCs in 80 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 μ l CD19- bzw. CD14-MicroBeads für 15 min nach mehrmaligem Aufschütteln bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit MACS-Puffer in einem 20 fachen Volumen dreimal gewaschen und auf eine mit MACS-Puffer äquilibrierte MS-Säule in der MACS-Apparatur pipetiert. Durch anschließendes Spülen mit insgesamt 15 ml Puffer in drei Schritten wurde die negative Zellefraktion aus der Säule ausgewaschen. Die magnetisch markierten Zellen wurden nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld mit Puffer eluiert und die Zellzahl wie in 4.1.4 beschrieben bestimmt.

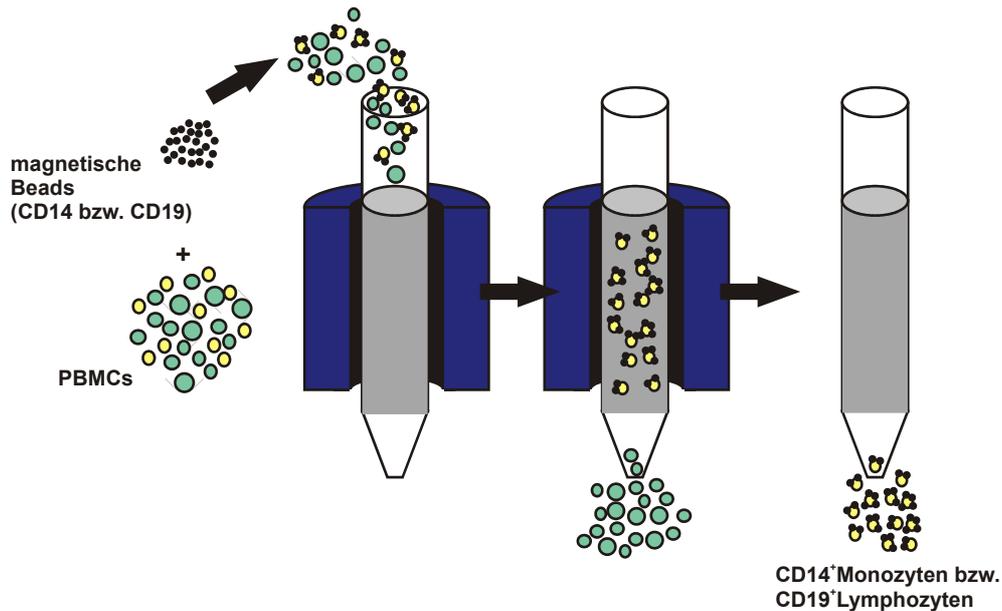


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Positiv-Selektion einer immunomagnetischen Separierung von CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ Lymphozyten.

4.5.2 Negativ-Selektion: Isolation von B-Zellen und T-Zellen

Für die Isolation von B-Zellen und T-Zellen wurde die indirekte Separation eingesetzt, damit diese Zellen, frei von magnetischen Mikropartikeln, für weitere Experimente verwendet werden konnten. Der B-Zell-Isolations-Kit beinhaltet dafür Biotin-konjugierte Antikörper gegen CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a. Beim PAN T-Zell-Isolations-Kit besteht der Biotin-Antikörper-Cocktail aus Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 und CD235a. Diese Antikörper-Cocktails markieren alle Zellen der PBMCs, außer den gewünschten B-Zellen und T-Zellen.

Die zu separierende PBMC-Suspension wurde in 40 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Gesamtzellen resuspendiert und mit 10 µl des entsprechenden Biotin-Antikörper-Cocktails versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurden 30 µl Puffer mit 20 µl Antibiotin-Microbeads zum Ansatz gegeben und für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Das führt zur Markierung aller unerwünschten Zellpopulationen. Die Zellen wurden mit Puffer mit dem 20 fachen Ansatzvolumen gewaschen und mit einem Volumen von 500 µl auf eine mit MACS-Puffer äquilibrierte MS-Säule in der MACS-Apparatur pipetiert. Die unmarkierten B- bzw. T-Zellen wurden anschließend mit 3 x 500 µl Puffer aus der Säule eluiert, während die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten wurden.

4.6 Bestimmung von Cytokin-Konzentrationen durch ELISA

Zur Bestimmung der IL-10-, GM-CSF-, und TNF- α -Cytokinausschüttung in den Zellkulturüberständen von CD14⁺-Monozyten wurden DuoSet ELISA Development Kits der Firma R&D Systems verwendet.

Die Beschichtung von Maxi-Sorp-96well-Platten mit entsprechendem Capture-Antikörper (IL-10: 4 μ g/ml, GM-CSF: 2 μ g/ml, TNF- α : 4 μ g/ml) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platten wurden dreimal mit 400 μ l PBS-Tween gewaschen und überschüssige Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 300 μ l Block-Puffer abgesättigt. Nach drei Waschschrritten wurden die Zellkulturüberstände 1:2 in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt aufgetragen. Dazu wurde jeweils eine serielle Verdünnungsreihe des Standards in PBS/BSA erstellt, wobei die Ausgangskonzentration für IL-10 4 ng/ml betrug, für GM-CSF und TNF- α 1 ng/ml. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert und danach dreimal mit 400 μ l PBS-Tween gewaschen. Die biotinylierten Detektionsantikörper anti-human-GM-CSF bzw. -TNF- α wurden in einer Konzentration von 1 μ g/ml in PBS/BSA verdünnt eingesetzt. Der biotinylierte Detektionsantikörper anti-human IL-10 wurde mit 2 % Hitze-inaktiviertem NGS in einer Konzentration von 400 ng/ml in PBS/BSA verdünnt eingesetzt. Die Inkubation erfolge über 2 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschrritten wurde das Enzymreagenz Streptavidin-HRP 1:200 in PBS/BSA verdünnt und nach 20 min Inkubation im Dunkeln erneut dreimal gewaschen. Die Entwicklung des ELISAs erfolgte mit einer Substratlösung (TMB-Substrat, Pharmingen) bei Raumtemperatur im Dunkeln bis zu einer deutlichen Blaufärbung. Nach maximal 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 1 M H₃PO₄-Lösung gestoppt und durch Messung der Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) die Konzentration der Proben im ELISA-Reader bestimmt.

4.7 Fluoreszenz-Mikroskopie

4.7.1 Färbung der Donorzellen mit CM-Dil

Für die fluoreszenz-mikroskopische Darstellung des Transfers wurden die Donorzellen mit dem stabilen Membranfarbstoff CM-Dil gefärbt. Dieser Farbstoff beinhaltet einen thiol-reaktiven Chloromethyl-Anteil, der eine kovalente Bindung an zelluläre Thiole ermöglicht. Dadurch ist dieser Membranfarbstoff stabiler und eignet sich für Fixierungen mit Aldehyden und Permeabilisierungen. Für die Färbung wurden die Zellen wie in 4.1.2 beschrieben aus der Kulturflasche abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Der Membranfarbstoff CM-Dil wurde 1:2000 in PBS verdünnt. Um eine homogene Färbung der Zellen zu erlangen

wurden sie nach gründlichem vortexen zunächst 5 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 4°C mit dem Farbstoff inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 50 ml PBS um den überschüssigen Farbstoff vollständig zu entfernen.

4.7.2 Fixierung und Einbettung

Der Transfer von CM-Dil gefärbten Zellen mit den Akzeptorzellen erfolgte wie in 4.4 beschrieben in Medium. Für die fluoreszenz-mikroskopische Darstellungen wurden die Ansätze nach dem Transfer in Medium mit PBS gewaschen und es folgte eine Zellisolierung durch immunomagnetische Separation (s. 4.5).

Für die Mikroskopie verwendete Coverslips wurden mit poly-D-Lysin Hydrobromid beschichtet. Poly-Lysin unterstützt die Zelladhäsion auf festen Unterlagen. Dazu wurden die Coverslips viermal eine Minute in eine poly-D-Lysin Hydrobromid Lösung (10 mg/ml in H₂O_{dest.}) getaucht und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Die in PBS resuspendierten Zellen wurden dann in einem Volumen von 400 µl auf die Deckgläser pipettiert und in 24-well-Platten für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Um die Zellen zu fixieren wurden die Coverslips für 4 min in 3,7 % Paraformaldehyd inkubiert und danach dreimal mit 1,5 ml PBS gewaschen.

Als Einbettmedium wurde Mowiol verwendet. Zum Einbetten wurde ein Tropfen erwärmtes Mowiol auf die Objektträger pipettiert und die Coverslips ohne Luftblasen auf die Objektträger gelegt. Um eine Festigkeit des Mowiols zu erreichen, wurden die Objekte bei 4°C gelagert bevor sie mikroskopiert wurden.

4.7.3 Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die Darstellung des Transfers von CM-Dil markierten Mikropartikeln auf PBMCs wurde das Fluoreszenz-Mikroskop DM RBE der Firma Leica verwendet. Die Aufnahmen wurden mit dem digitalen Kamerasystem DC 300 F (Leica) durchgeführt und mit dem Leica-Programm QWin ausgewertet.

4.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 zur Ermittlung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Prozentzahlen weiterverarbeitet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde der

zweiseitige Students t-Test für gepaarte Ergebnisse unterschiedlicher n-Zahlen verwendet. Dieser Test erlaubt es zu entscheiden, ob der zufällige Fehler signifikant größer oder kleiner ist als vorgeschrieben. Bei den durchgeführten statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$) zu Grunde gelegt.

5 Ergebnisse

Die experimentelle Strategie dieser Arbeit basiert auf der Hypothese, dass verschiedene eukaryontische Zellen Mikropartikel freisetzen und diese von anderen Zellen (z.B. Monozyten und Lymphozyten) aufgenommen werden.

Um den Mechanismus des Transfers von Mikropartikeln zu untersuchen, wurden verschiedene experimentelle Richtungen eingeschlagen. Zunächst wurden der Aufbau der Mikropartikel und der Transfer dieser Mikropartikel mittels verschiedener Substanzen, die Membranfusionen beeinflussen, näher charakterisiert. Da Mikropartikel in peripherem Blut zirkulieren, wurde anschließend der Transfer unter physiologischen Bedingungen getestet und der Einfluss des Transfers auf zelluläre Funktionen untersucht.

5.1 Charakterisierung der Mikropartikel

Für die Bildung von Mikropartikeln wurden CHO-Zellen, die mit humanem CCR5 stabil transfiziert waren, bzw. Kato III-Zellen (humane Magenkarzinomzellen) in einer Konzentration von 4×10^7 Zellen in 20 ml MEM- bzw. RPMI-Medium für 90 min inkubiert. Nachdem die Zellen bei $200 \times g$ für 10 min pelletiert wurden, wurde der zellfreie Überstand 10 min bei $16.000 \times g$ zentrifugiert um die freigesetzten Mikropartikel zu pelletieren. Mittels FACS-Analysen konnten die Mikropartikel, die sich anhand ihrer Größe und Granularität von Zelltrümmern und Verunreinigungen abgrenzen lassen, dargestellt werden (Abbildung 5.1) und liegen oberhalb dieser Zellfragmente. Die Zelldebris-Fraktion stellt hierbei den nach dem Pelletieren der Mikropartikel gewonnenen Überstand dar und enthält keine Mikropartikel.

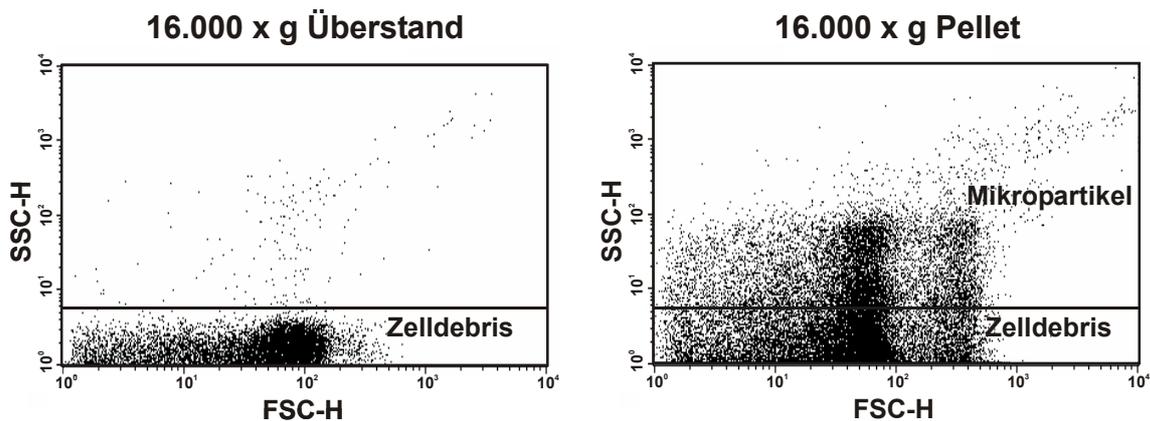


Abbildung 5.1: FACS-Analyse von Mikropartikeln. CHO-Zellen wurden 90 min in Medium inkubiert um Mikropartikel zu sezernieren. Der zellfreie Überstand wurde 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert um die Mikropartikel zu pelletieren. Im FACS konnten die Mikropartikel (rechts) anhand ihrer Größe und Granularität im „forward / sideward scatter“ von Zellfragmenten und Zelldebris (links) abgegrenzt werden. Zellfragmente und Zelldebris stellen den 16.000 x g-Überstand der Mikropartikel-Fraktion dar.

Mikropartikel sind kleine Membranvesikel, die von der Plasmamembran einer Vielzahl verschiedener Zellen freigesetzt werden und sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Komponenten der Ursprungszelle enthalten (Armstrong et al., 1988; Beaudoin and Grondin, 1991). Durch den Prozess des Abschnürens von Mikropartikeln geht die Phospholipid-Asymmetrie der ursprünglichen Plasmamembran verloren und das normalerweise in der inneren Lipidschicht vorkommende saure Phosphatidylserin ist bei Membranpartikeln auf der Außenseite zu finden.

Da die Phosphatidylserinasymmetrie von Mikropartikeln verloren geht, erfolgte der Nachweis des Phosphatidylserins auf der Außenseite der Mikropartikel mit Annexin V, das durch seine Ca^{2+} -abhängige Bindung an saure Phospholipide charakterisiert ist. Mittels Annexin V-FITC konnte eine Bindung auf Mikropartikeln gezeigt werden (Abbildung 5.2). Mikropartikel von Kato-Zellen, die für Transfer-Experimente herangezogen wurden, waren für die FACS-Analysen mit dem lipophilen Membranfarbstoff Dil gefärbt. In Abbildung 5.2 sind Mikropartikel dargestellt, die von gefärbten Kato-Zellen sezerniert wurden und Dil positiv sind. Auch die Zelldebris-Fractionen, die aus dem 16.000 x g-Überstand der Mikropartikel gewonnen wurden, wurden im FACS analysiert, zeigten aber keine Annexin V-Bindung bzw. Dil-Färbung.

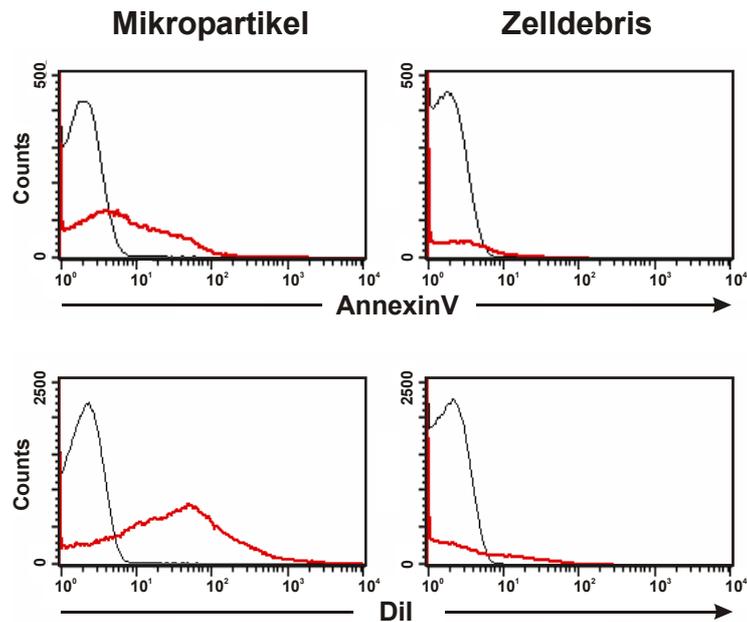


Abbildung 5.2: Charakterisierung der Mikropartikel. Die linken Histogramme zeigen Mikropartikel von Kato-Zellen, die bei 16.000 x g pelletiert wurden. Pelletierte Mikropartikel wurden mit Annexin V-FITC (rote Linie im oberen Bild) gefärbt um Phosphatidylserin auf deren Oberfläche nachzuweisen. Für die Annexin V-Kontrolle wurden die Mikropartikel in Annexin V-Bindungspuffer inkubiert (graue Linie im oberen Bild). Mikropartikel, die von Dil gefärbten Kato-Zellen freigesetzt wurden, zeigten eine positive Dil-Färbung (rote Linie im unteren Histogramm). Als Kontrolle wurden Mikropartikel von ungefärbten Zellen verwendet (graue Linie im unteren Histogramm). Die Zellfragmente und Zelldebris (rechte Histogramme) zeigten keine Annexin V-FITC- bzw. Dil-Färbung.

5.2 Transfer von isolierten Mikropartikeln auf Akzeptorzellen

5.2.1 Transfer von Dil markierten Mikropartikeln

Ein Anhaltspunkt für einen interzellulären Transfer von Rezeptoren durch Mikropartikel war die Beobachtung, dass von CCR5-positiven-CHO-Zellen sezernierte Membranpartikel CCR5 enthalten und diesen Rezeptor auf CCR5-negative-Zellen übertragen können (Mack et al., 2000).

Um den Transfer von Mikropartikeln zu studieren, wurden Donorzellen mit dem Membranfarbstoff Dil gefärbt und unter physiologischen Bedingungen ohne Stimulation in Kulturmedium für 90 min kultiviert, um die Bildung von Mikropartikeln zu induzieren. Es wurden sowohl CHO-Zellen, die mit humanem CCR5 stabil transfiziert waren, als auch Kato III-Zellen als Donorzellen für diese

Ansätze verwendet. Die Zellen wurden bei 200 x g pelletiert und der zellfreie Überstand bei 15.000 x g erneut zentrifugiert, um die Mikropartikel zu pelletieren. Sowohl der Überstand, als auch das resultierende Mikropartikel-Pellet dieser Zentrifugation wurde für 90 min in Kulturmedium mit PBMCs inkubiert. Die Monozyten wurden anschließend für die FACS-Analyse mit α CD14-APC markiert, die Lymphozyten mit α CD4-FITC.

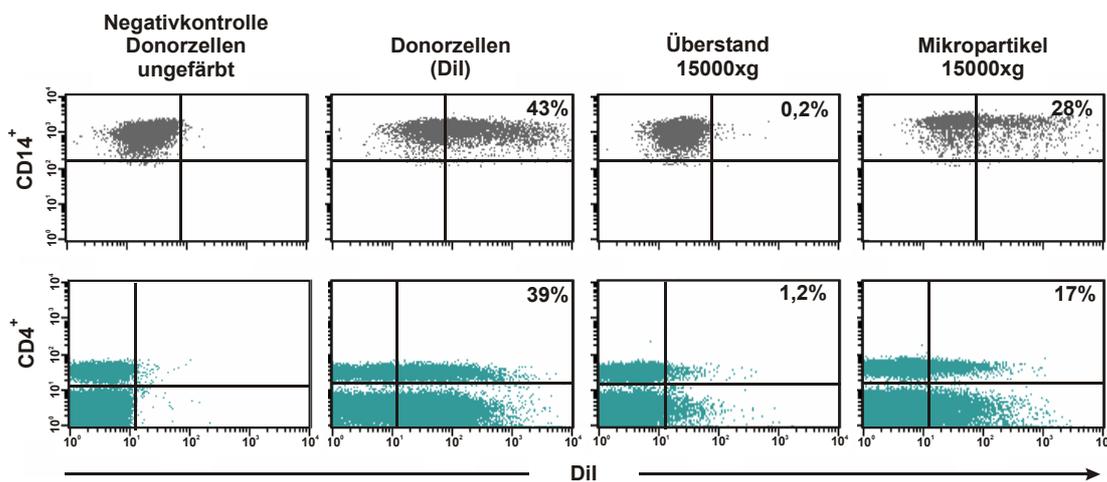


Abbildung 5.3: Transfer von Dil markierten Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten (oben) und CD4⁺ Lymphozyten (unten). Akzeptorzellen wurden mit Dil-gefärbten CHO-Zellen oder mit bei 15.000 x g pelletierten Mikropartikeln 90 min in Medium koinkubiert und im FACS analysiert. Im linken Bild sind die Akzeptorzellen nach Koinkubation mit ungefärbten Donorzellen dargestellt; sie bilden den Ausgangswert für die Berechnung des spezifischen Transfers. In der zweiten Spalte sind Akzeptorzellen nach Inkubation mit gefärbten Donorzellen abgebildet. Die rechten Plots zeigen Akzeptorzellen nach Inkubation mit isolierten Mikropartikeln (Spalte 4) bzw. nach Inkubation mit dem Überstand der isolierten Mikropartikel (Spalte 3).

Abbildung 5.3 zeigt die FACS-Analyse des Transfers von Dil gefärbten CHO-Zellen und von isolierten Mikropartikeln, die bei Zentrifugation mit 15.000 x g aus dem zellfreien Überstand von Dil gefärbten Donorzellen pelletiert wurden, auf PBMCs. Um einen Ausgangswert für die Berechnung des spezifischen Transfers zu erhalten, wurden Akzeptorzellen mit ungefärbten intakten Donorzellen inkubiert. Nach der Koinkubation von gefärbten intakten Donorzellen mit PBMCs konnte sowohl auf 43 % der CD14⁺ Monozyten, als auch auf 39 % der CD4⁺ Lymphozyten der Membranfarbstoff Dil detektiert werden. Wurde der Mikropartikel-freie Überstand (generiert durch Zentrifugation bei 15.000 x g) verwendet, war keine Färbung auf PBMCs zu erkennen. Die Pellet-Fraktion dieser Zentrifugation (entspricht isolierten Mikropartikeln) allerdings lässt einen spezifischen Transfer des Dil Farbstoffes auf 28 % der CD14⁺ Monozyten und 17 % der CD4⁺ T-Zellen erkennen. Diese Werte sind im Vergleich zum Transfer mit gefärbten intakten Donorzellen gemindert, da

wahrscheinlich durch die erste Zentrifugation bei 200 x g zur Entfernung der intakten Zellen auch viele Mikropartikel verloren gehen, die bei einer direkten Koinkubation von Donor- und Akzeptorzellen im Medium vorhanden sind.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass bei der Konikubation von CHO-Zellen mit PBMCs eine Übertragung von gefärbten Membranpartikeln stattgefunden hat. Dagegen konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass der Mikropartikel-freie Überstand nach einer Zentrifugation bei 15.000 x g zu keiner Dil Färbung der Akzeptorzellen führt und somit ausgeschlossen werden kann, dass Farbstoffreste im Überstand die Färbung verursachen.

Als nächstes wurde untersucht bei welcher Geschwindigkeit Mikropartikel pelletiert werden können, um einen Transfer zu erzeugen. Nach der Bildung von Mikropartikeln aus Dil gefärbten CHO-Zellen, wurde der zellfreie Überstand für eine differentielle Zentrifugation aufgeteilt und bei verschiedenen Geschwindigkeiten zentrifugiert. Die daraus entstandenen Pellets wurden für den Transfer auf PBMCs eingesetzt. Für die Auswertung des spezifischen Transfers mittels FACS wurden die Monozyten mit α CD14 markiert. Die Abgrenzung der Lymphozyten erfolgte über deren Größe und Granularität.

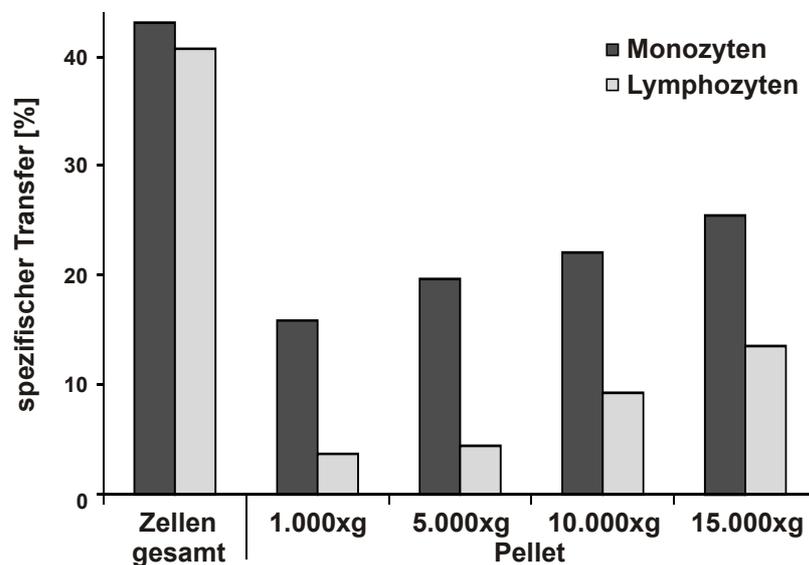


Abbildung 5.4: Transfer von verschiedenen Pellet-Fractionen nach differentieller Zentrifugation. Nach 90 min Inkubation zur Generierung von Mikropartikeln wurden die zuvor Dil markierten Donorzellen bei 300 x g abzentrifugiert und der daraus resultierende Überstand für die differentielle Zentrifugation herangezogen. Das Diagramm zeigt den Mikropartikel-Transfer der gesamten Donorzellen und der verschiedenen Pellet-Fractionen auf CD14⁺ Monozyten und Lymphozyten.

Wie in Abbildung 5.4 dargestellt, wurden die freigesetzten Mikropartikel durch Zentrifugation schon bei $> 1.000 \times g$ pelletiert und zeigten einen deutlichen Transfer auf Monozyten und Lymphozyten, der jedoch durch Zentrifugation mit höherer Geschwindigkeit verstärkt werden konnte. Die bei $15.000 \times g$ pelletierten Mikropartikel zeigten den höchsten Mikropartikel-Transfer auf 28 % der Monozyten, da höchstwahrscheinlich die Mikropartikel in der Größe variieren ($0,1 - 1 \mu\text{m}$) und erst bei dieser Zentrifugation auch kleinere Mikropartikel pelletiert werden konnten.

5.2.2 Transfer in Abhängigkeit von Inkubationstemperatur und -zeit

Die bisherigen Ergebnisse des Transfers deuten darauf hin, dass es sich bei der Freisetzung und der Aufnahme von Mikropartikeln um einen normalen physiologischen Ablauf der zellulären Funktion handelt.

Um diese Hypothese zu untermauern wurde der Transfer mit Dil gefärbten Kato-Zellen in Abhängigkeit von Inkubations-Temperatur und -Zeit untersucht. Dazu wurde die Koinkubation der Kato-Zellen mit den PBMCs als Akzeptorzellen sowohl bei 4°C als auch bei 37°C durchgeführt. Ebenso wurde die optimale Koinkubationszeit definiert, indem die Donor- und Akzeptorzellen für 0 min, 30 min und 60 min zusammen inkubiert wurden und anschließend im FACS der spezifische Transfer für Monozyten und Lymphozyten analysiert wurde.

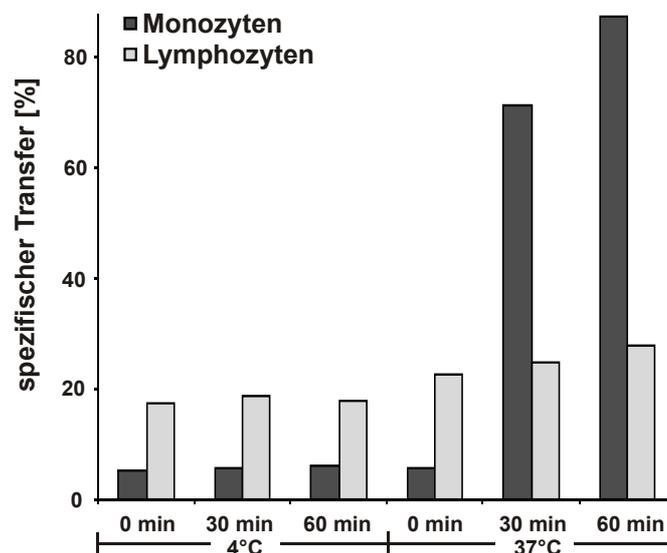


Abbildung 5.5: Spezifischer Transfer von Mikropartikeln in Abhängigkeit von der Koinkubations-Zeit und -Temperatur. Die Dil gefärbten Kato-Zellen wurden für 0 min, 30 min bzw. 60 min mit PBMCs bei 4°C bzw. 37°C koinkubiert. Die PBMCs wurden für die FACS-Analyse mit $\alpha\text{CD14-APC}$ und $\alpha\text{CD4-FITC}$ gefärbt.

Aus Abbildung 5.5 lässt sich entnehmen, dass der Transfer von Mikropartikeln nur unter physiologischen Bedingungen bei 37°C stattfinden kann. Auch ist zu sehen, dass schon nach 30 min ein spezifischer Transfer auf Monozyten von 71 % erreicht wurde. Da jedoch für die folgenden Experimente die PBMCs von verschiedenen Spendern gewonnen wurden, traten leichte Schwankungen beim Transfer auf. Aus vergleichbaren Experimenten mit PBMCs verschiedener Spender zeigte sich, dass die optimale Koinkubationszeit bei 90 min liegt. Um besser vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurden die folgenden Transferversuche somit bei 37°C, 96 % relativer Feuchte, 5 % CO₂ und einer Koinkubationszeit von 90 min durchgeführt.

5.2.3 Transfer von Mikropartikeln von Kato-Zellen

Eine wichtige Konsequenz der interzellulären Übertragung von Mikropartikeln ist der Transfer von Membranproteinen der Ursprungszelle auf Akzeptorzellen.

Werden Kato-Zellen als Donorzellen für die Generierung von Mikropartikeln verwendet, eignet sich das Membranprotein EpCAM hervorragend um den Mikropartikel-Transfer darzustellen, da EpCAM stark auf Kato-Zellen, aber nicht auf Leukozyten als Akzeptorzellen exprimiert wird. EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein, das auf einer Reihe von epithelialen Tumoren, besonders gastrointestinalen Tumoren, exprimiert wird (Gottlinger et al., 1986). In Abbildung 5.6 ist die starke Expression von EpCAM auf Kato-Zellen dargestellt. Das Glykoprotein konnte auch auf der Oberfläche von Mikropartikeln, die von Kato-Zellen gebildet wurden, nachgewiesen werden. Auf unbehandelten Monozyten und Lymphozyten ist hingegen keine Expression von EpCAM zu erkennen.

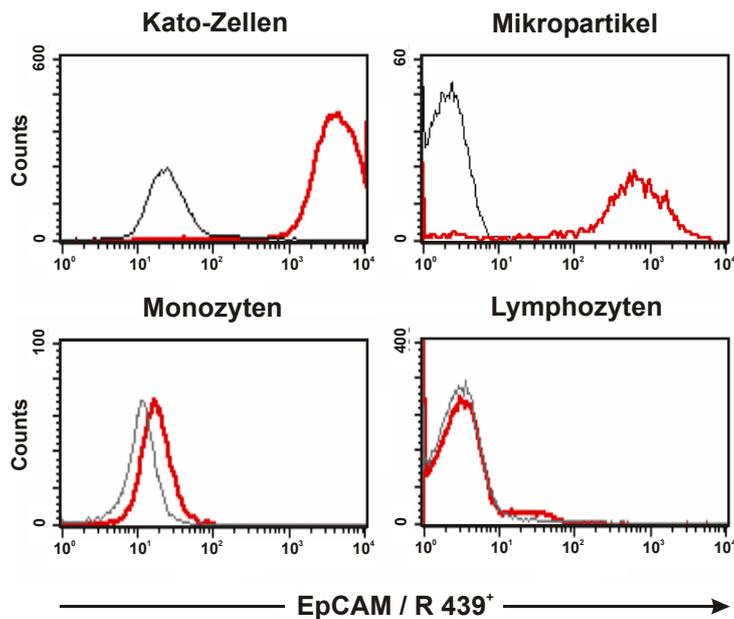


Abbildung 5.6: Nachweis von EpCAM auf Membranoberflächen. Eine spezifische Bindung des Antikörpers gegen EpCAM (Klon 3B10C9) ist nur auf Kato-Zellen und Mikropartikeln, die von Kato-Zellen sezerniert wurden, nicht aber auf Monozyten und Lymphozyten zu erkennen (rote Linie). Die Bindung ist mit dem Sekundärantikörper R 439 dargestellt. Die dünnen grauen Linien zeigen die Isotypkontrollen mit IgG1 (10 μ g/ml).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EpCAM auch auf den Mikropartikeln von Kato-Zellen vorhanden ist, wurde im Folgenden der Transfer dieses Kato-Zell-spezifischen Proteins auf EpCAM-negative Zellen, wie PBMCs, untersucht.

Nach der Konikubation von Kato-Zellen mit PBMCs konnte auf Monozyten und Lymphozyten mit Hilfe eines Antikörpers das transmembrane Glykoprotein EpCAM nachgewiesen werden. Dazu wurden die Donorzellen mit den Akzeptorzellen in Kulturmedium koinkubiert und danach mit dem monoklonalen Antikörper gegen EpCAM (1:100) bzw. IgG1 als Isotypkontrolle und dem PE-markierten Sekundärantikörper R439 detektiert.

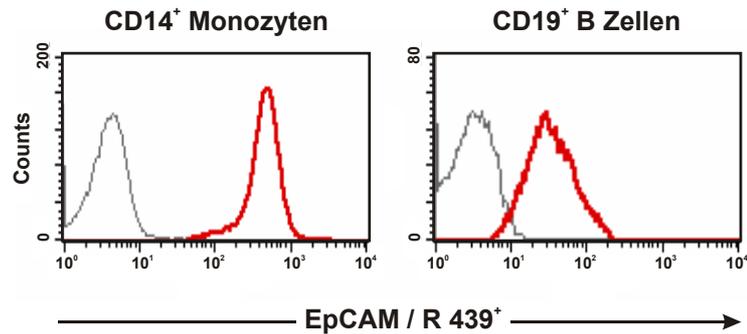


Abbildung 5.7: FACS-Analyse des Transfers von EpCAM. Nach der Inkubation von EpCAM⁺-Kato-Zellen mit PBMCs in Medium konnte EpCAM auf Monozyten und CD19⁺ Lymphozyten (rote Linie) nachgewiesen werden. Die Bindung des Antikörpers ohne Koinkubation mit Kato-Zellen zeigen die grauen Linien.

Die FACS-Histogramme in Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7 veranschaulichen, dass die Donorzellen EpCAM positive Mikropartikel abgeben und diese Mikropartikel von Monozyten und Lymphozyten aufgenommen werden und infolgedessen EpCAM auf der Zelloberfläche dieser Akzeptorzellen nachzuweisen ist. Das Experiment in Abbildung 5.7 ergab einen spezifischen Transfer von EpCAM positiven Mikropartikeln auf 79 % der Monozyten und 22 % der B-Zellen.

Diese Experimente demonstrieren die Aufnahme bzw. Bindung von Mikropartikeln durch Akzeptorzellen und das Vorhandensein von Mikropartikelproteinen auf deren Zellmembran. Der Transfer von Mikropartikeln und deren Membranproteinen stellt einen Mechanismus dar, wie *in vivo* ein Austausch von Proteinen zwischen verschiedenen Zellen stattfinden kann und damit „Kommunikation“ zwischen Zellen stattfinden kann.

5.2.4 Transfer von PBMC auf PBMC

Monozyten sind in der Lage beträchtliche Mengen an Membranvesikeln nach Aktivierung mit Lipopolysaccharid (LPS) freizusetzen (Satta et al., 1994). Auch in humanen arteriosklerotischen Plaques lassen sich zahlreiche Mikropartikel nachweisen, die vor allem von Monozyten und Lymphozyten stammen (Mallat et al., 1999).

In folgendem Experiment veranschaulichen FACS-Analysen die Freisetzung von Mikropartikeln von nicht stimulierten PBMCs und deren Aufnahme durch Monozyten und Lymphozyten.

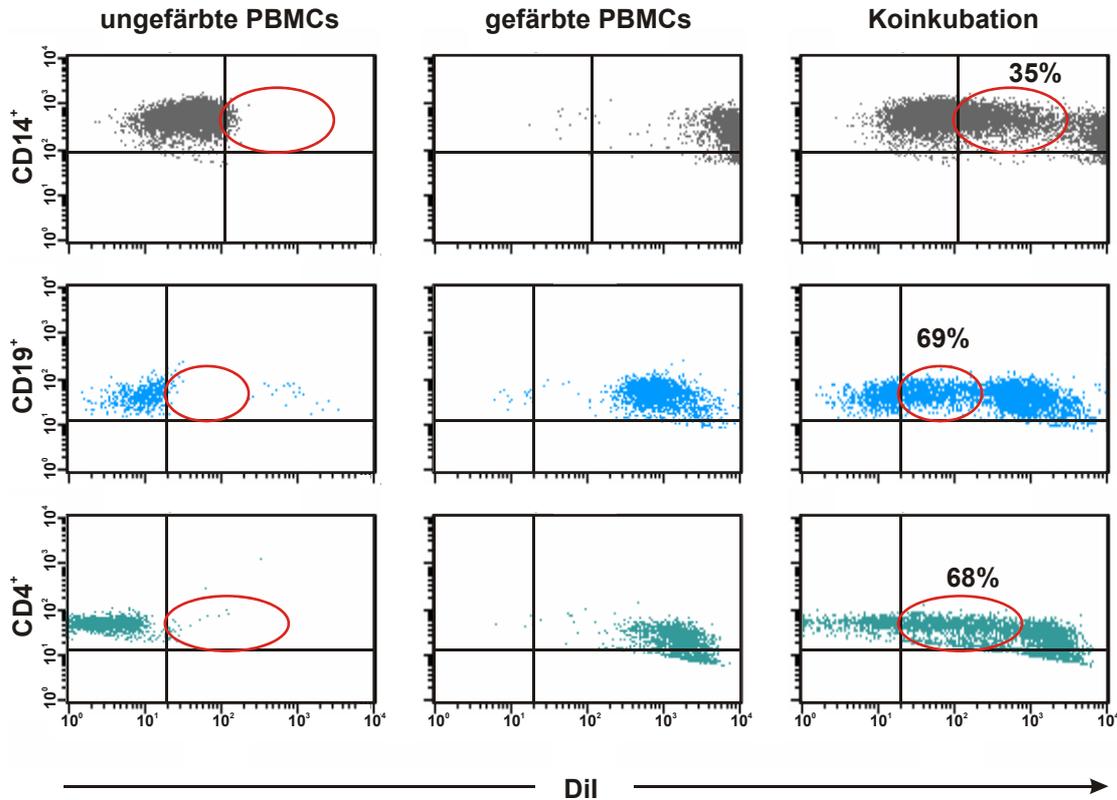


Abbildung 5.8: FACS-Analysen des Mikropartikel-Transfers von PBMCs auf $CD14^+$ Monozyten, $CD19^+$ B-Zellen und $CD4^+$ -Lymphozyten. Ungefärbte PBMCs (links) wurden mit Dil markierten PBMCs (mitte) zusammen für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach der Koinkubation ist der spezifische Transfer (rote Ovale) von Mikropartikeln in den rechten Abbildungen zu erkennen.

Ungefärbte PBMCs wurden mit Dil markierten PBMCs in RPMI Medium koinkubiert und anschließend im FACS auf Transfer untersucht. In Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass unmarkierte PBMCs nach der Inkubation mit Dil gefärbten PBMCs Dil gefärbte Mikropartikel aufgenommen haben. Das Ergebnis zeigt einen spezifischen Transfer von Mikropartikeln auf 35 % der $CD14^+$ Monozyten, 69 % der $CD19^+$ B-Zellen und 68 % der $CD4^+$ T-Zellen.

Dies bedeutet, dass ein Transfer von Mikropartikeln, die von PBMCs auch ohne Stimulation freigesetzt werden, auf Monozyten und Lymphozyten stattfindet.

5.2.5 Transfer von PBMCs auf Endothelzellen

Die Freisetzung von Membranvesikeln wurde erstmals bei Thrombozyten beschrieben und findet dort nach Aktivierung mittels Thrombin, Kollagen oder mechanischem Stress statt (George et al., 1982). Von Thrombozyten freigesetzte Mikropartikel können weitere Thrombozyten oder Endothelzellen aktivieren (Barry et al., 1997). Während einer Entzündungsreaktion führen Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen zur verstärkten Adhäsion von Leukozyten. Die Endothelzellen werden dabei durch Thrombozytenpartikel zur Expression des Adhäsionsmoleküles ICAM-1 angeregt (Barry et al., 1998).

Um herauszufinden, ob es bei einem solchen Kontakt auch zum Transfer von Mikropartikeln kommt, wurden Endothelzell-Linien aus der Lunge und der Milz mit Dil markierten PBMCs koinkubiert.

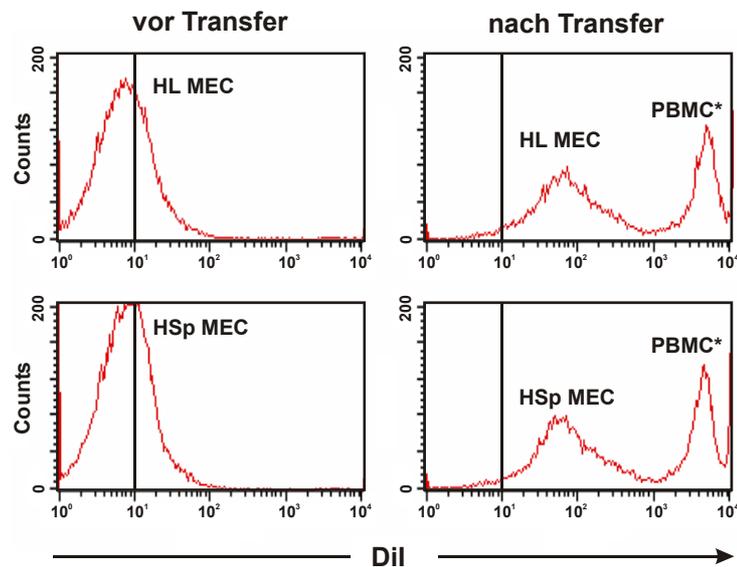


Abbildung 5.9: Aufnahme von Mikropartikeln durch Endothelzellen. Endothelzellen aus der Lunge (oben) und der Milz (unten) zeigen nach einer Koinkubation mit markierten PBMCs verstärkte Dil-Färbung (rechts) im Vergleich zu Zellen vor einer Koinkubation (links). HL MEC: humane mikrovaskuläre Lungen-Endothel-Zelllinie; HSp MEC: humane mikrovaskuläre Milz-Endothel-Zelllinie.

Die beiden Endothel-Zelllinien wurden für diesen Versuch in Suspension gebracht und mit Dil markierten PBMCs in RPMI Medium inkubiert. Nach 90 min Koinkubation konnte mittels FACS-Analyse eine Übertragung von Dil markierten Mikropartikeln auf die Endothelzellen beobachtet werden. Dabei konnten die Endothelzellen von den PBMCs durch die Dil-Färbung abgegrenzt werden. In Abbildung 5.9 sind links unbehandelte Endothelzellen dargestellt. In den rechten Histogrammen sind die Endothelzellen nach dem Transfer mit gefärbten

PBMCs, welche den rechten Peak ausmachen, zu erkennen. Bei beiden Endothel-Zelllinien ist eine deutliche Dil Positivität durch die Aufnahme Dil positiver Mikropartikel zu verzeichnen und es konnte ein spezifischer Transfer von 65 % bei Endothelzellen aus der Lunge (HL MEC) und 68 % bei Endothelzellen aus der Milz (HSp MEC) ermittelt werden.

5.2.6 Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen des Transfers von Mikropartikeln

Neben FACS-Analysen wurde für den Transfer-Nachweis auch die Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. Kato-Zellen wurden mit dem stabilen Membranfarbstoff CM-Dil gefärbt und mit PBMCs für 90 min bei 37°C koninkubiert. Anschließend wurden die Monozyten mit magnetischen CD14-Micro Beads angereichert, so dass ca. 90 % Monozyten und 10 % Kato-Zellen vorhanden sind. Diese wurden nach Fixierung mit 3,7 % Paraformaldehyd mit Mowiol eingebettet und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

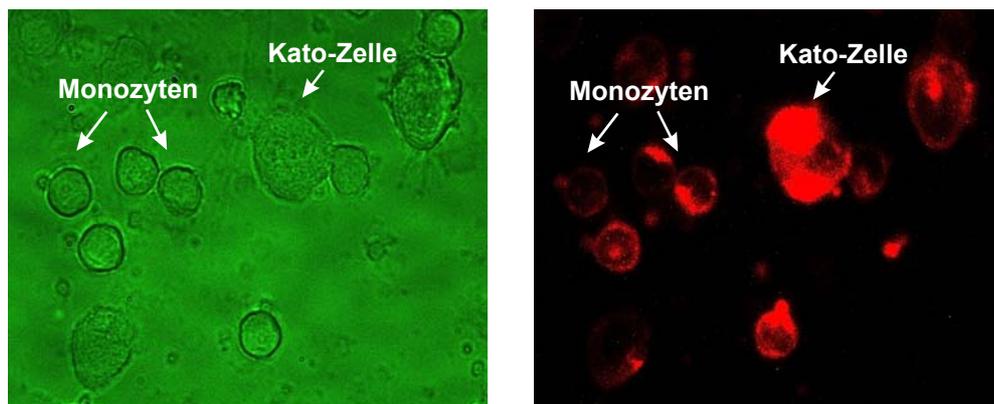


Abbildung 5.10: Mikropartikel-Transfer von Kato-Zellen auf Monozyten. Im Hellfeld (links) sind die Monozyten durch ihre Größe von den Kato-Zellen zu unterscheiden. Fluoreszenz-mikroskopisch (rechts) sind Dil markierte Kato-Zellen und Monozyten nach der Mikropartikel-Aufnahme zu erkennen.

Im Hellfeld sind die Monozyten an Hand ihrer Größe von den Kato-Zellen leicht zu unterscheiden. Die fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme in Abbildung 5.10 zeigt eine CM-Dil markierte Kato-Zelle, daneben sind Monozyten zu erkennen, die mehrere gefärbte Mikropartikel sowohl zellmembrannah, als auch intrazellulär aufgenommen haben.

5.3 Beeinflussung des Mikropartikel-Transfers

Der Transfer von Mikropartikeln erfolgt, wie bisher gezeigt werden konnte, zwischen verschiedenen Zellen unter physiologischen Bedingungen ohne Stimulation. Bei der Aufnahme dieser Mikropartikel durch Akzeptorzellen kann es sich um verschiedene Mechanismen handeln. Die Bindung der Mikropartikel an Zellen kann durch eine Integration in die Zellmembran erfolgen oder durch eine oberflächliche Adhäsion an die Zielzelle zustande kommen. Prozesse, die eine solche Fusion von Vesikeln beschreiben, spielen in vielen biologischen Systemen, wie z. B. bei der Aufnahme apoptotischer Zellen, der Phagozytose, der Endo- und Exozytose oder an der neuronalen Synapse, eine wichtige Rolle.

In den folgenden Experimenten wurde auf Basis dieser bisher beschriebenen Mechanismen der Vesikelfusion versucht, die Aufnahme der Mikropartikel zu untersuchen.

5.3.1 Phagozytose-Rezeptoren und *membrane-blebbing*

5.3.1.1 Einfluss von Phagozytose-Rezeptoren

Für die Erkennung und Aufnahme von apoptotischen Vesikeln sind verschiedene Rezeptoren auf Phagozyten-Membranen beschrieben (Fadok and Chimini, 2001). Für den Transfer-Prozess der Mikropartikel, die ähnlich den apoptotischen Vesikeln Phosphatidylserin auf der Außenseite präsentieren, wurden im nachstehenden Versuch einige dieser Rezeptoren untersucht. Dazu wurden ein Antikörper gegen den LPS-Rezeptor CD14 (Klon MEM-18), α CD29 (Klon 4B4) gegen β_1 Integrine, α CD36 (Klon CB38) gegen den Glykoprotein IV-Rezeptor und ein Antikörper gegen den Phosphatidylserin-Rezeptor (mAb 217) eingesetzt. Die Akzeptorzellen (PBMCs) wurde mit jeweils 10 μ g/ml dieser Antikörper und den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert und anschließend mit Dil gefärbten Kato-Zellen koinkubiert. Die Analyse des Transfers auf die spezifischen Zellpopulationen erfolgte im FACS durch CD14 markierte Monozyten und die Abgrenzung der Lymphozyten-Population anhand ihrer Größe und Granularität (siehe Abbildung 4.2).

Tabelle 5.1: Mikropartikel-Transfer in Gegenwart von Antikörpern gegen Phagozytose-Rezeptoren. PBMCs wurden mit α CD14 (Klon MEM-18), α CD29 (Klon 4B4), α CD36 (Klon CB38), α PSR (mAb 217) und den entsprechenden Isotypkontrollen präinkubiert und mit Kato-Zellen koinkubiert. Eine Hemmung (-) oder eine Verstärkung (+) des Transfers wurden im FACS für CD14⁺ Monozyten und Lymphozyten bestimmt. Die Tabelle zeigt exemplarische Ergebnisse aus je 2-4 vergleichbaren Resultaten.

Zellart	Hemmung (-) und Verstärkung (+) des spezifischen Transfers [%] durch			
	α CD14	α CD29	α CD36	mAb 217
CD14 ⁺ Monozyten	-13	+5	-7	+2
Lymphozyten	+7	+2	-6	-3

Aus Tabelle 5.1 ist zu entnehmen, dass keiner der untersuchten Antikörper gegen Phagozytose-Rezeptoren den Transfer von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten oder Lymphozyten beeinflussen konnte.

5.3.1.2 Einfluss des ROCK-I-Inhibitors Y-27632

Während der Apoptose werden Änderungen der Zellmorphologie, darunter die Kontraktion der Zelle und Membranausstülpungen, beobachtet. Dabei spielt das Aktin-Myosin-System eine wichtige Rolle. Die Rho-assoziierte Kinase ROCK-I, welche an der Phosphorylierung von Myosin und der Bindung von Aktin-Myosin-Filamenten an die Plasmamembran beteiligt ist, wird während der Apoptose durch Caspasen gespalten und aktiviert. Die Aktivität des ROCK-I Proteins ist für die Ausstülpung der Membran (*membrane blebbing*) und die Bildung apoptotischer Vesikel bedeutend. Die zellpermeable Substanz Y-27632 (ein Pyridin-Derivat) inhibiert die katalytische Aktivität von ROCK-I (Ishizaki et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob der ROCK-I-Inhibitor Y-27632 die Bildung der Mikropartikel von Donorzellen und damit verbunden auch den Transfer hemmt, wurden Dil markierte Kato-Zellen als Donorzellen mit 10 μ M Y-27632 inkubiert und danach mit PBMCs als Akzeptorzellen koinkubiert, wobei der Inhibitor während des Transfers vorhanden war.

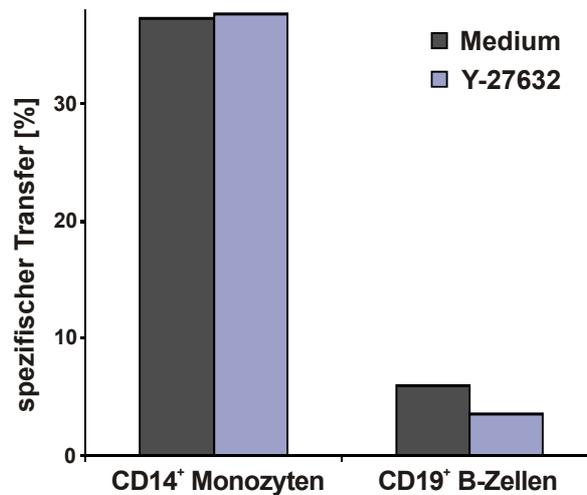


Abbildung 5.11: Spezifischer Transfer in Gegenwart des ROCK-I-Inhibitors Y-27632. Die Dil markierten Donorzellen wurden mit Medium als Kontrolle und Y-27632 vorinkubiert. Während der Koinkubation mit PBMCs wurde der Inhibitor im Versuchsansatz belassen. Das Diagramm zeigt, dass sich der Transfer auf CD14⁺ Monozyten nicht ändert und die Aufnahme von CD19⁺ B-Zellen minimal beeinflusst wird.

Die Bildung der Mikropartikel konnte, wie Abbildung 5.11 zeigt, durch den ROCK-I-Inhibitor Y-27632 nicht gehemmt werden. Der Transfer auf CD14⁺ Monozyten blieb im Vergleich zur Mediumkontrolle unverändert. Da für den Transfer auf Monozyten auch nach einer Behandlung der Donorzellen mit Y-27632 ausreichend Mikropartikel zur Verfügung standen ist anzunehmen, dass die geringe Reduktion des Transfers auf CD19⁺ B-Zellen nicht auf den Einfluss von Y-27632 zurückzuführen ist. Weiterhin legt dieses Experiment nahe, dass es sich bei der Bildung von Mikropartikeln offenbar nicht um apoptotische Vesikel handelt.

5.3.2 Einfluss von Cytochalasin auf den Transfer

Um zu untersuchen, ob das Zytoskelett bei der Aufnahme von Mikropartikeln involviert sein könnte, wurden die Akzeptorzellen mit Zellmembran-permeablem Cytochalasin vorinkubiert. Die beiden Toxine Cytochalasin B und Cytochalasin D inhibieren die Aktin-Polymerisation und Phagozytose, indem sie an die schnell wachsenden Enden der Aktin-Filamente (F-Aktin) binden (Ryning and Remington, 1978); (Davis et al., 1971).

Für den Versuch wurden PBMCs für 60 min bei 37°C mit 1 µg/ml Cytochalasin D inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen mit 0,1 %

DMSO in RPMI-Medium inkubiert. Nach der Inkubation mit Dil markierten Kato-Zellen als Donorzellen, wurde im FACS der Transfer von Mikropartikeln auf $CD14^+$ Monozyten und $CD19^+$ B-Zellen untersucht.

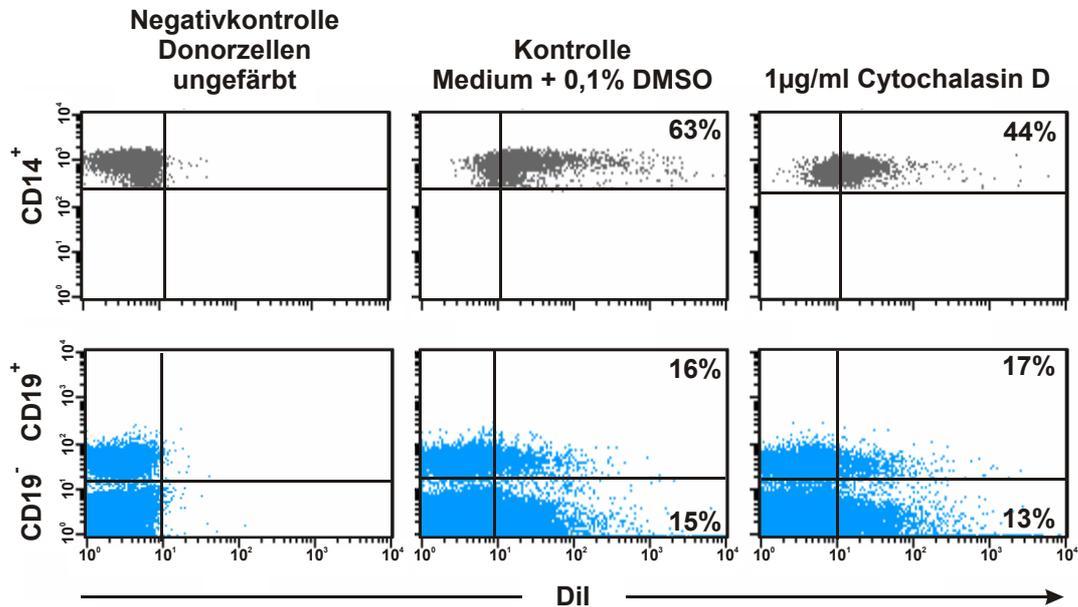


Abbildung 5.12: FACS-Analyse des Mikropartikel-Transfers auf $CD14^+$ Monozyten und $CD19^+$ B-Zellen. Die Plots zeigen den Transfer der Dil markierten Donorzellen auf $CD14^+$ Monozyten und $CD19^+$ B-Zellen nach Inkubation der Akzeptorzellen mit 0,1% DMSO in Medium als Kontrolle und 1 µg/ml Cytochalasin D; die Zellen wurden nach mehreren Waschschritten koinkubiert.

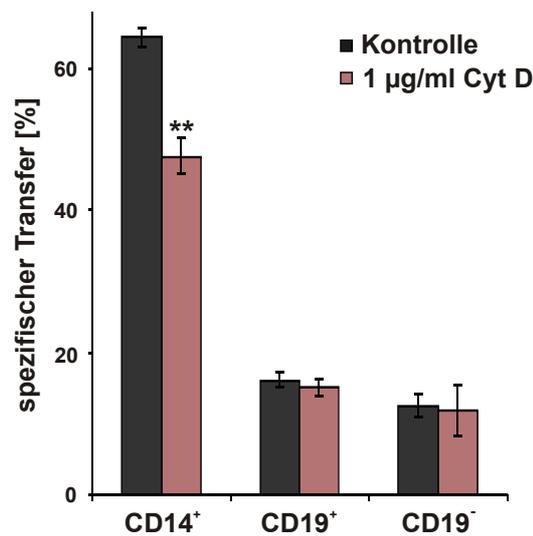


Abbildung 5.13: Transfer nach Inkubation der Akzeptorzellen mit Cytochalasin D. Die PBMCs wurden mit 1 µg/ml Cytochalasin D inkubiert bevor sie mit Dil markierten Kato-Zellen koinkubiert wurden. Bei der FACS-Analyse wurde der Transfer für $CD14^+$ Monozyten und $CD19^+$ B-Zellen ausgewertet. Die Negativkontrolle enthält 0,1% DMSO in RPMI Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des spezifischen Transfers (** $p < 0.01$ vs. Kontrolle, $n=4$).

Wie Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 zeigen, wurde die Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten durch Cytochalasin D gehemmt, während der Transfer von Mikropartikeln auf CD19⁺ Lymphozyten nicht beeinflusst wurde. Der reduzierte Transfer durch Cytochalasin war für Monozyten ($p < 0,01$) statistisch signifikant. Dies deutet darauf hin, dass Mikropartikel von B-Zellen und Monozyten in unterschiedlicher Weise aufgenommen werden. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die Integration von Mikropartikeln in Monozyten teilweise einen aktiven Prozess impliziert, der durch Cytochalasin inhibiert werden kann, während dies bei B-Zellen nicht der Fall ist.

Des Weiteren war der Transfer durch Cytochalasin nur dann gehemmt, wenn die Akzeptorzellen vorbehandelt waren. Eine Inkubation der Donorzellen mit Cytochalasin hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung von Mikropartikeln und den Transfer.

5.3.3 Einfluss von Annexin V auf den Transfer

Die durchflußzytometrische Charakterisierung der Mikropartikel zeigte, ähnlich den apoptotischen Vesikeln, dass diese Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran präsentieren (siehe 5.1). Um zu untersuchen, ob das Phosphatidylserin bei der Aufnahme von Mikropartikeln eine Rolle spielt, wurde versucht, mit Annexin V den Transfer zu beeinflussen.

Annexin V ist ein 35 kDa Protein mit der Eigenschaft Ca²⁺-abhängig an negative Phospholipide zu binden und hat dementsprechend eine sehr hohe Affinität zu Phosphatidylserin (Raynal and Pollard, 1994). Annexin V kommt überwiegend als intrazelluläres Protein an der cytosolischen Seite der Plasmamembran vor, kann aber auch aus der Zelle freigesetzt werden und an die Membranaußenseite binden (Pfaffle et al., 1988).

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob der Transfer auf Monozyten und Lymphozyten durch Zugabe von Annexin V intensiviert werden kann und ob Annexin V-FITC, welches auf der Oberfläche von Mikropartikeln bindet (Abbildung 5.2), den Transfer beeinflusst. Dafür wurden die Donorzellen und die Akzeptorzellen mit rekombinantem Annexin V (50 µg/ml), Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin in Ca²⁺-haltigem Bindungspuffer vorinkubiert und für die Koinkubation in diesen Ansätzen gelassen. Für die FACS-Analysen wurden die Monozyten mit α CD14-APC markiert, die T-Zellen mit α CD4-FITC.

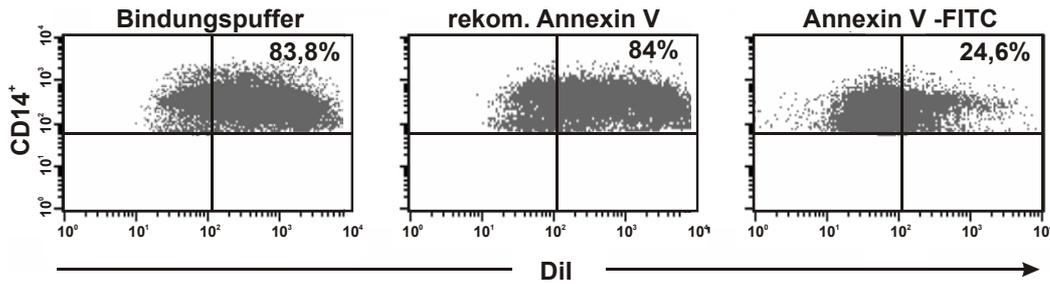


Abbildung 5.14: FACS-Plot des Mikropartikel-Transfers auf CD14⁺ Monozyten. Die Plots zeigen den Transfer der Dil markierten Donorzellen auf CD14⁺ Monozyten nach Inkubation der Donor- und Akzeptorzellen mit Bindungspuffer als Kontrolle, rekombinantem Annexin V (50 µg/ml) und Annexin V-FITC (5 µg/ml); die Zellen wurden ohne Waschschrift koinkubiert.

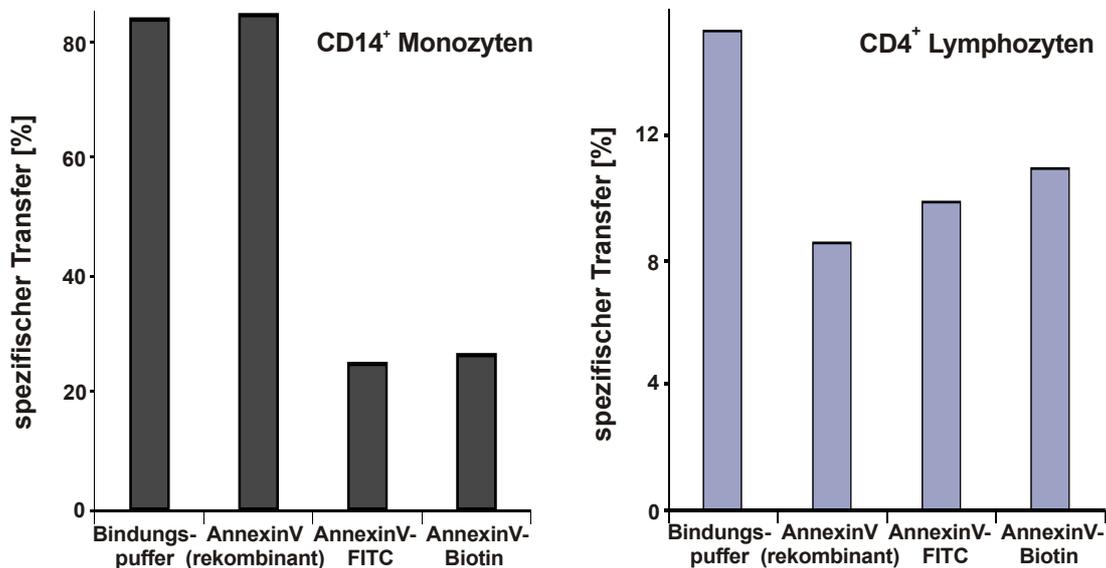


Abbildung 5.15: Spezifischer Mikropartikel-Transfer auf CD14⁺ Monozyten und Lymphozyten nach Koinkubation von PBMCs mit Dil-gefärbten CHO-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem Annexin V (50 µg/ml), Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin (je 5 µg/ml in Bindungspuffer verdünnt). Die Kontrolle wurde in Annexin V-Bindungspuffer durchgeführt.

Der Transfer von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten zeigte, wie in Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15 zu erkennen ist, in Anwesenheit von Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin einen um 70 % reduzierten Transfer. Die Aufnahme von Mikropartikeln wurde jedoch durch das rekombinante Annexin V nicht beeinträchtigt. Wurden die Zellen nach der Vorinkubation mit Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin mit Bindungspuffer gewaschen und die Koinkubation in Medium durchgeführt, dann änderte sich der Transfer im Vergleich zur Kontrolle nicht (Abbildung nicht dargestellt). Ergebnisse für Lymphozyten waren bei

diesen Experimenten sehr divergent und zeigten nur tendenziell eine verringerte Bindung von Mikropartikeln nach Inkubation mit rekombinantem Annexin V. Bei $CD4^+$ T-Zellen wurde kaum eine Änderungen im Transfer durch Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin ersichtlich.

Entsprechend dem Versuch mit Cytochalasin (siehe 5.3.2) zeigte sich jedoch auch in diesen Experimenten eine unterschiedliche Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten und Lymphozyten. Die Tatsache, dass durch Annexin V-FITC und Annexin V-Biotin der Mikropartikel-Transfer auf Monozyten herabgesetzt wird, lässt vermuten, dass Annexin V für die Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten relevant ist. Möglicherweise verdrängen FITC- oder Biotin-markiertes Annexin V das sicherlich zum Teil schon an Phosphatidylserin gebundene zelleigene Annexin V. Wir vermuten, dass das FITC- und Biotin- modifizierte Annexin V nicht mehr in der Lage ist, den Mikropartikel-Transfer auf Monozyten zu unterstützen.

Im folgenden Experiment wurde mit einem monoklonalen Annexin V Antikörper die Expression von Annexin V auf verschiedenen Zellen untersucht.

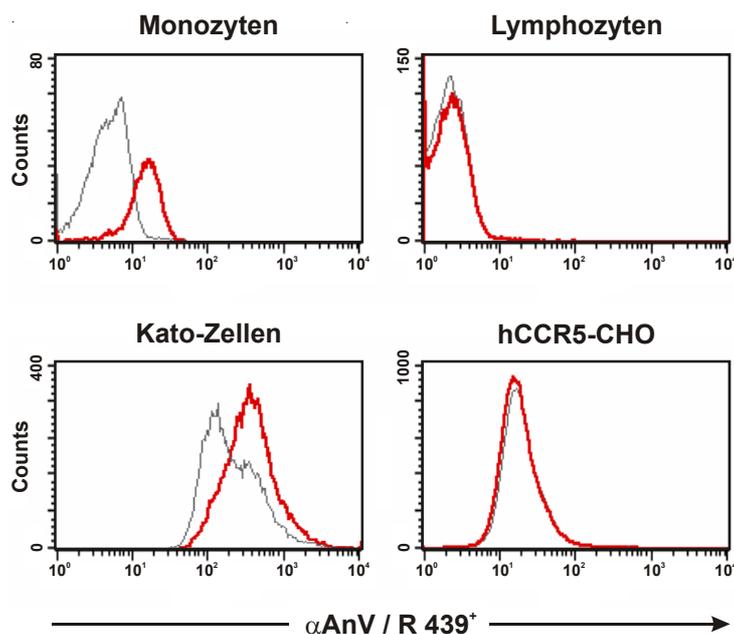


Abbildung 5.16: Histogrammanalyse zur Annexin V-Expression auf verschiedenen Zellen. PBMCs, Kato-Zellen und hCCR5-CHO-Zellen wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ α Annexin V (UMC01) (dicke rote Linie) und $10 \mu\text{g/ml}$ IgG1 als Kontrolle (dünne graue Linie) inkubiert; der Antikörper wurde mit dem PE-markierten Sekundärantikörper R439 detekiert. Der AnV-Antikörper bindet nur auf einer Subpopulation von Monozyten.

Die FACS-Histogramme in Abbildung 5.16 lassen erkennen, dass Annexin V auf der Zelloberfläche von Monozyten zu finden ist. Auf Kato-Zellen zeigte sich eine geringe Bindung des Annexin V Antikörpers, während auf Lymphozyten und CHO-Zellen keine Bindung nachweisbar war. Dies könnte darauf hindeuten, dass extrazellulär auf Monozyten vorkommendes Annexin V bei dem Transfer eine Rolle spielt.

In nachfolgendem Experiment wurde nun untersucht, ob das auf den Monozyten vorhandene Annexin V bei dem Mikropartikel-Transfer von Bedeutung ist. Hierzu wurden die PBMCs und die Dil markierten Kato-Zellen, die auch eine geringe Expression von Annexin V aufweisen, mit einem monoklonalen Annexin V Antikörper (Klon UMC01) inkubiert. Als Isotypkontrolle wurden die PBMCs mit 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG1 inkubiert. Ohne die Zellen zu waschen, wurden sie koinkubiert und für die FACS-Analyse mit α CD14-APC und α CD19-FITC markiert.

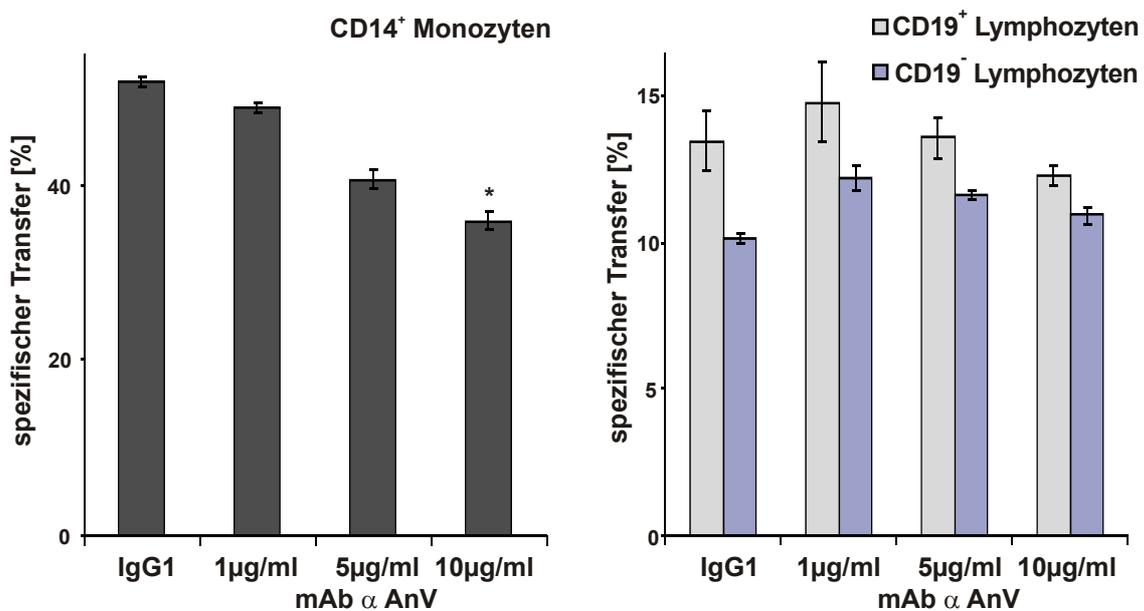


Abbildung 5.17: Spezifischer Mikropartikel-Transfer auf Monozyten und B-Zellen nach Inkubation mit dem Annexin V (AnV) Antikörper. PBMCs und Dil markierte Kato-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ monoklonalem α Annexin V (UMC01) inkubiert und anschließend koinkubiert. Die CD14⁺ Monozyten zeigten einen reduzierten Transfer nach Inkubation mit den Antikörpern. Bei den Lymphozyten reduzierte sich der Transfer auch bei höheren Antikörperkonzentrationen nur sehr gering. (mAb: monoklonaler Antikörper). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des spezifischen Transfers (* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, $n=3$).

In Abbildung 5.17 ist deutlich zu erkennen, dass nach der Inkubation mit Annexin V-Antikörpern der Transfer von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten durch den monoklonalen Antikörper (10 µg/ml) um 32 % gehemmt wurde. Der Transfer auf CD19⁺ B-Zellen wurde durch Inkubation mit 10 µg/ml monoklonalem Antikörper nur leicht reduziert (9 %). Bei der restlichen CD19⁻ Lymphozyten-Population, die hauptsächlich aus T-Zellen besteht, konnte keine Hemmung des Transfers durch den Antikörper gegen Annexin V erreicht werden. Ähnlich wie bei Annexin V-FITC bzw. -Biotin, musste auch der Annexin V-Antikörper während der Koinkubation von Akzeptor- und Donorzellen vorhanden sein, um eine Inhibition des Mikropartikel-Transfers zu erzielen. Durch die Bindung dieses Antikörpers wurde gezeigt, dass Annexin V auf den Monozyten und möglicherweise auf Kato-Zellen, nicht aber auf Lymphozyten und B-Zellen, bei der Aufnahme der Mikropartikel beteiligt ist und durch spezifische Antikörper blockiert werden kann.

5.3.4 Ca²⁺-abhängiger Mikropartikel-Transfer

Bei der Regulation verschiedener Zellprozesse spielt Calcium in gelöster Form, aber auch an Proteine gebunden, eine zentrale Rolle. Die Externalisierung von Phosphatidylserin ist bei Erythrozyten und Thrombozyten (Comfurius et al., 1990), so wie während der Apoptose (Hampton et al., 1996), von extrazellulärem Ca²⁺ abhängig. Ein zytoplasmatisch kontinuierlich erhöhter Ca²⁺-Spiegel scheint ebenfalls zur Aufrechterhaltung dieser Externalisierungsprozesse notwendig zu sein (Williamson et al., 1995).

Ferner spielt Ca²⁺ in Zusammenhang mit Annexin V eine wichtige Rolle. In Kristallstruktur-Analysen konnte gezeigt werden, dass Annexin V bis zu fünf Ca²⁺-Ionen binden kann (Huber et al., 1990). Die genaue Funktion der Annexine ist bislang noch ungeklärt, dennoch wird ihnen aufgrund ihrer starken Assoziation zu Zellmembranen eine Ca²⁺-abhängige Funktion bei der Membranorganisation, Zelladhäsion und der Vesikel-Fusion zugeschrieben. Die Ca²⁺-abhängige Bindung der Annexine an Phosphatidylserin ist reversibel und die Beseitigung von Ca²⁺ löst die Annexine von der Phospholipid-Matrix.

Zelluläre Prozesse, die durch zweiwertige Metallionen, wie z. B. Mg²⁺ oder Ca²⁺ aktiviert werden, können durch das komplexbildende Chelator-Agens Äthylendiamintetraacetat (EDTA) beeinträchtigt werden. Die Hemmbarkeit durch EDTA dient als Kriterium für die Beteiligung zweiwertige Metallionen, entweder als Reaktionskomponenten oder als Bausteine der beteiligten Komponenten.

5.3.4.1 Einfluss von Ca^{2+} und EDTA

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss von Ca^{2+} auf den Transfer von Mikropartikeln untersucht werden. Hierzu wurden sowohl die Akzeptorzellen (PBMCs) als auch die Donorzellen (Dil markierte Kato-Zellen) mit Medium (Ca^{2+} -Gehalt von 1 mM) und zusätzlich 1 mM CaCl_2 bzw. mit 2,5 mM EDTA vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen gewaschen, um das von der Plasmamembran eventuell gelöste Annexin oder andere Moleküle, die Ca^{2+} für eine Bindung benötigen, zu entfernen. Die Koinkubation erfolgte dann wieder in Medium, in Medium mit zusätzlich 1 mM CaCl_2 bzw. mit 2,5 mM EDTA.

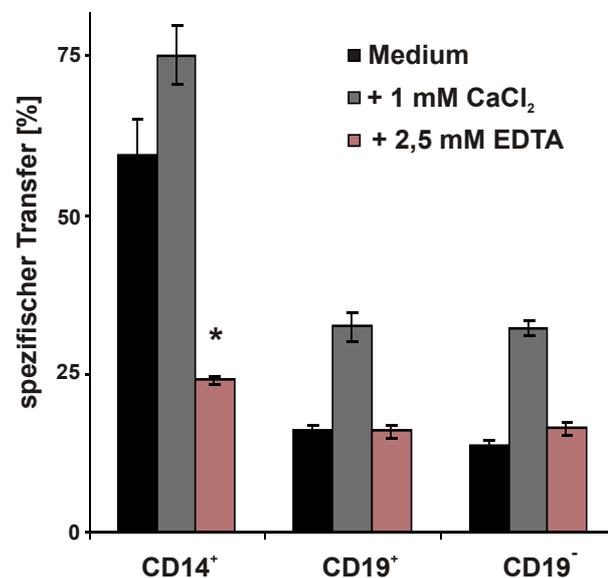


Abbildung 5.18: Mikropartikel-Transfer mit Ca^{2+} und EDTA. PBMCs und Kato-Zellen wurden mit Medium, Medium + 1 mM CaCl_2 und Medium + 2,5 mM EDTA prä- und koinkubiert. Nur in Anwesenheit von EDTA während der Koinkubation wurde die Aufnahme von Mikropartikeln von CD14⁺ Monozyten inhibiert. Durch zusätzliches Calcium wurde auch der Transfer auf Lymphozyten erhöht, allerdings durch EDTA nicht beeinflusst. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des spezifischen Transfers (* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, $n=3$).

Der Transfer von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten wurde durch Zugabe von CaCl_2 erhöht, während der Transfer durch EDTA um 60 % reduziert wurde (Abbildung 5.18). Die Hemmung durch Zugabe von EDTA war für Monozyten ($p < 0,05$) statistisch signifikant. Die Effekte durch Ca^{2+} und EDTA waren jedoch nur dann so deutlich, wenn die Zusätze während der Koinkubation vorhanden waren. Wurden in einem weiteren Versuch die Zellen nach einer Vorinkubation mit CaCl_2 und EDTA gewaschen und der Transfer in Ca^{2+} -freiem Medium durchgeführt, konnte nur eine minimale Änderung der Mikropartikel-Übertragung

festgestellt werden (Abbildung 5.19). Ferner konnte durch eine Präinkubation mit EDTA und einer anschließenden Koinkubation in mit Ca^{2+} angereichertem Medium der Effekt von EDTA wieder aufgehoben werden.

Bei CD19^+ und CD19^- Lymphozyten zeigten sich durch Zugabe von CaCl_2 nur geringe Effekte, während durch EDTA keine Differenz zur Kontrolle ersichtlich war.

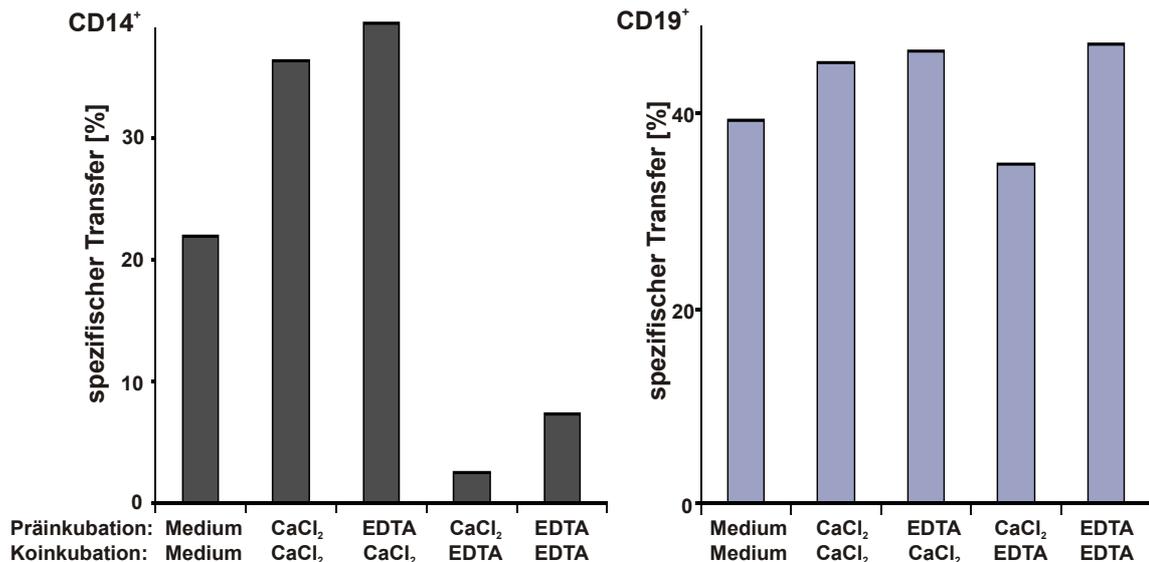


Abbildung 5.19: Einfluss von CaCl_2 auf den Mikropartikel-Transfer auf Monozyten und B-Zellen. Sowohl Donor- als auch Akzeptorzellen wurden mit Medium (1 mM CaCl_2), Medium plus 5 mM CaCl_2 bzw. Medium plus 2,5 mM EDTA präinkubiert, danach gewaschen und anschließend in Medium (1 mM CaCl_2), Medium plus 5 mM CaCl_2 bzw. plus 2,5 mM EDTA koinkubiert. Der Transfer auf CD14^+ Monozyten wurde durch CaCl_2 , das während der Koinkubation vorhanden war, erhöht, auch nachdem die Zellen zuvor mit EDTA behandelt waren. Während der Koinkubation gegenwärtiges EDTA reduzierten den Mikropartikel-Transfer. Der Transfer auf B-Zellen wurde durch CaCl_2 und EDTA nur gering beeinflusst.

Aus diesen Versuchen wurde deutlich, dass Monozyten und Lymphozyten zur Aufnahme von Mikropartikeln unterschiedliche Mechanismen verwenden und Ca^{2+} bei Monozyten essentiell ist. Auch wurde gezeigt, dass der reduzierende Effekt von EDTA reversibel ist und eine erneute Zugabe von Ca^{2+} den Transfer wieder verstärkt.

Die Notwendigkeit von Ca^{2+} beim Transfer auf Monozyten könnte auf die Ca^{2+} -abhängige Funktion von Annexin V zurückzuführen sein, welches bei Vesikelfusionen eine wesentliche Rolle einnimmt.

5.3.4.2 Einfluss von Lanthan und Zink

Nachdem sich gezeigt hat, dass extrazelluläres Ca^{2+} für die Bildung von Mikropartikeln und deren Aufnahme durch PBMCs relevant ist, wurde in den folgenden Experimenten die Bedeutung von intrazellulärem Ca^{2+} analysiert. Ein Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -Kanäle, sowie die Ca^{2+} -ATPase in intrazellulären Speicherorten, wird durch Zink (Zn^{2+}) und Lanthan (La^{3+}) blockiert.

PBMCs und Dil gefärbte Kato-Zellen wurden getrennt voneinander mit Medium als Kontrolle, 0,1 mM und 1 mM LaCl_3 bzw. 0,1 mM und 1 mM ZnCl_2 15 min bei 37°C präinkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden diese behandelten Zellen in Medium für den Transfer zusammen mit unbehandelten PBMCs als Akzeptorzellen bzw. Kato-Zellen als Donorzellen inkubiert.

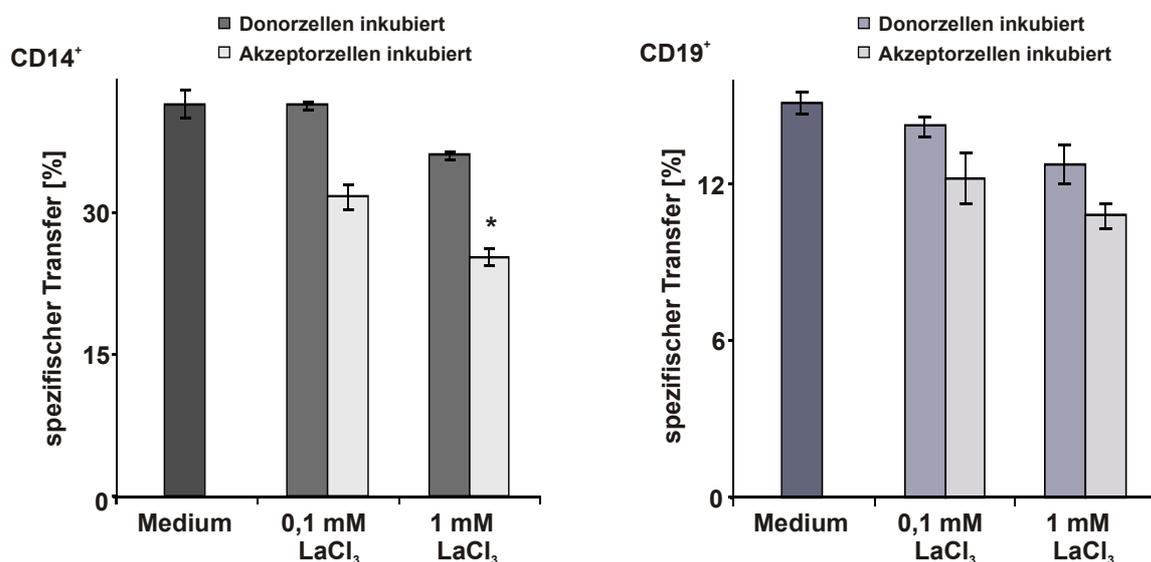


Abbildung 5.20: Spezifischer Mikropartikel-Transfer nach Behandlung mit Lanthanchlorid. Donor- und Akzeptorzellen wurden jeweils mit 0,1 mM bzw. 1 mM LaCl_3 inkubiert und vor der Inkubation gewaschen. Der Transfer auf CD14^+ Monozyten wurde nur dann gehemmt, wenn diese mit LaCl_3 behandelt waren. Die Mikropartikel-Aufnahme durch CD19^+ B Zellen war durch LaCl_3 nur gering betroffen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des spezifischen Transfers (* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, $n=3$).

Die Analysen mittels FACS zeigten nach einer Behandlung der Donorzellen mit LaCl_3 keine Änderungen des Mikropartikel-Transfers auf Monozyten, allerdings wurde die Aufnahme der Mikropartikel nach Inkubation der Akzeptorzellen mit 1 mM LaCl_3 um mehr als die Hälfte (56 %) im Vergleich zum Mikropartikel-Transfer in Medium verringert (Abbildung 5.20). Hingegen war bei Lymphozyten keine signifikante Veränderung zu erkennen.

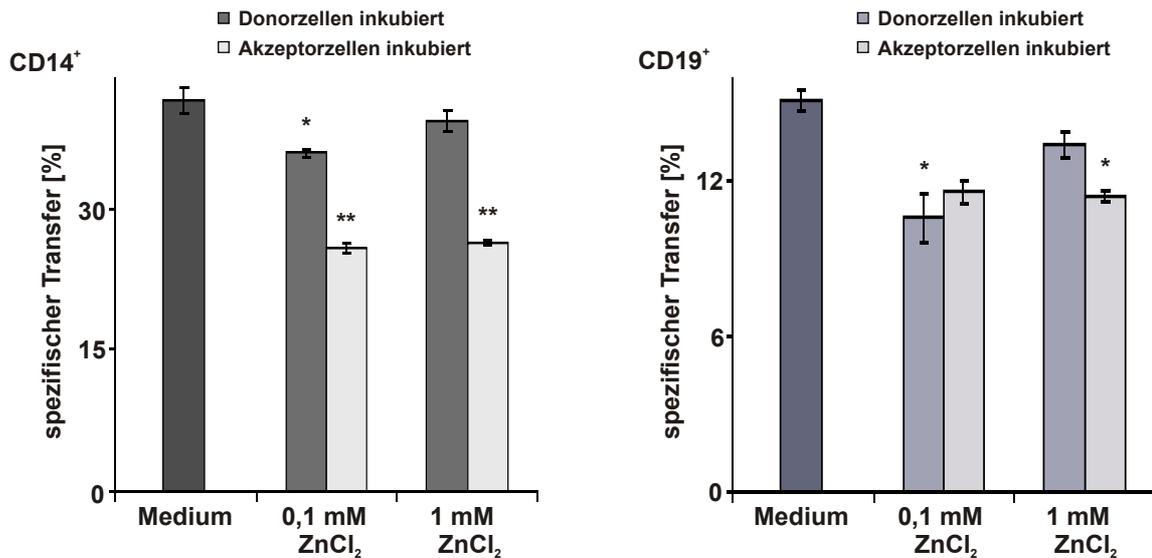


Abbildung 5.21: Spezifischer Mikropartikel-Transfer nach Behandlung mit Zinkchlorid. Donor- und Akzeptorzellen wurden separat mit 0,1 mM bzw. 1 mM ZnCl₂ inkubiert und vor der Konikubation gewaschen. Der Transfer auf CD14⁺ Monozyten wurde durch ZnCl₂ gehemmt, wenn diese auch vorbehandelt waren. Auch die Mikropartikel-Aufnahme durch CD19⁺ B Zellen änderte sich nach Inkubation der Akzeptorzellen mit ZnCl₂. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM des spezifischen Transfers (*p<0.05, **p<0.01 vs. Kontrolle, n=3).

Ähnlich den Ergebnissen mit Lanthanchlorid, konnte nach einer Inkubation der Akzeptorzellen (PBMCs) mit 1 mM Zinkchlorid eine Reduktion des Transfers auf Monozyten um 36 % gemessen werden (Abbildung 5.21). Auch bei CD19⁺ Lymphozyten zeigte sich ein geringer Effekt (25 %) durch eine Behandlung mit 1 mM ZnCl₂.

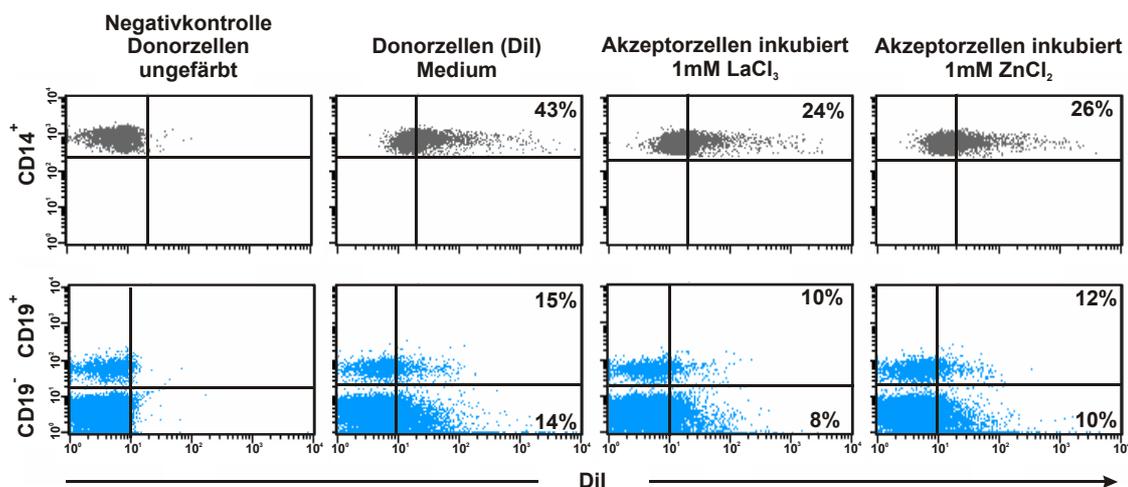


Abbildung 5.22: FACS-Analyse des Mikropartikel-Transfers nach Inkubation der PBMCs als Akzeptorzellen mit 1 mM LaCl₃ bzw. 1 mM ZnCl₂.

Sowohl LaCl_3 , als auch ZnCl_2 hemmen den Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten irreversibel, denn auch nach mehrmaligem Waschen der mit den Substanzen vorinkubierten Zellen wird der Mikropartikel-Transfer reduziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aufnahme von Vesikeln bei Monozyten ein aktiver Prozess ist, der zusätzlich zu extrazellulärem Ca^{2+} auch zyttoplasmatisches Ca^{2+} erfordert, welches vor allem bei der intrazellulären Signaltransduktion notwendig ist. Der Transfer auf Lymphozyten scheint, wie auch schon die Experimente mit EDTA zeigten, durch einen anderen Mechanismus abzulaufen, der weitgehend Ca^{2+} -unabhängig ist.

5.3.5 Einfluss von Heparin auf den Transfer

Heparin gehört zu den Glykosaminglykanen und wirkt als Antikoagulans. In der Literatur wird unter anderem eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von Heparin an Annexin V beschrieben. Dies gilt jedoch nicht für das Glykosaminglykan Chondroitinsulfat, (Ishitsuka et al., 1998); (Capila et al., 2001).

Der Einfluss von Glykosaminglykanen auf den Transfer von Mikropartikeln wurde mit Dil markierten Kato-Zellen als Donorzellen und PBMCs als Akzeptorzellen durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Ansätze gemacht. Zum einen wurden nur die Donorzellen oder die Akzeptorzellen mit 100 U/ml bzw. 500 U/ml Heparin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Chondroitinsulfat A präinkubiert, wobei vor der Koinkubation die Ansätze gewaschen und der Transfer in Medium ausgeführt wurde. Zum anderen wurden beide Zelltypen mit den Glykosaminglykanen vorinkubiert und vor der Koinkubation mit PBS gewaschen. Auch bei diesem Ansatz wurde die Koinkubation in Medium durchgeführt. Die Analyse des Mikropartikel-Transfers auf die spezifischen Zellpopulationen erfolgte im FACS durch α CD14 für Monozyten und durch Abgrenzung der Lymphozyten-Population anhand ihrer Größe und Granularität (siehe Abbildung 4.2).

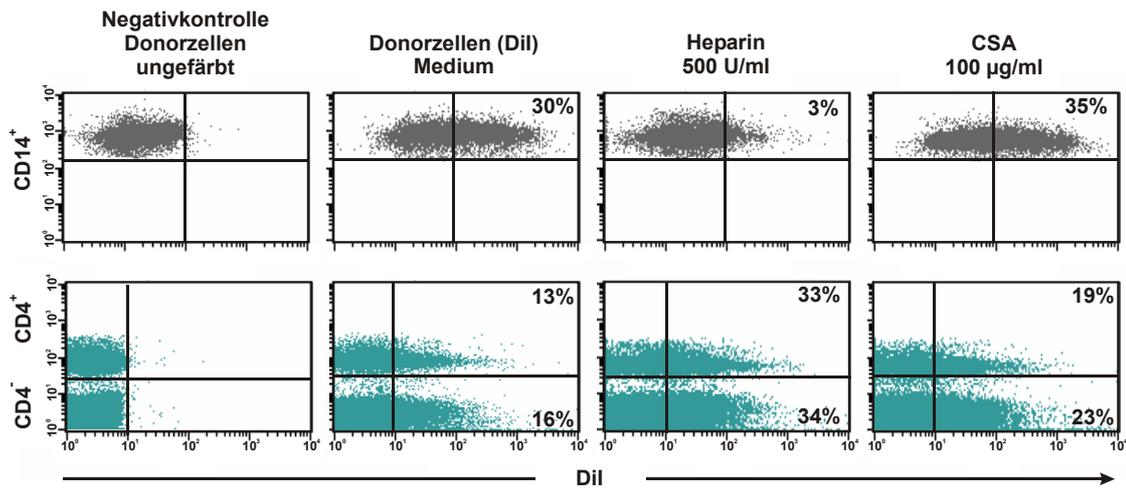


Abbildung 5.23: FACS-Plot des Mikropartikel-Transfer nach Inkubation der Donor- und Akzeptorzellen mit Medium, Heparin bzw. Chondroitinsulfat A (CSA) und anschließender Koinkubation in Medium. Die oberen Plots zeigen den Transfer auf CD14⁺ Monozyten, die unteren den Transfer auf CD4⁺ Lymphozyten (obere Quadranten) bzw. CD4⁻ Lymphozyten (untere Quadranten).

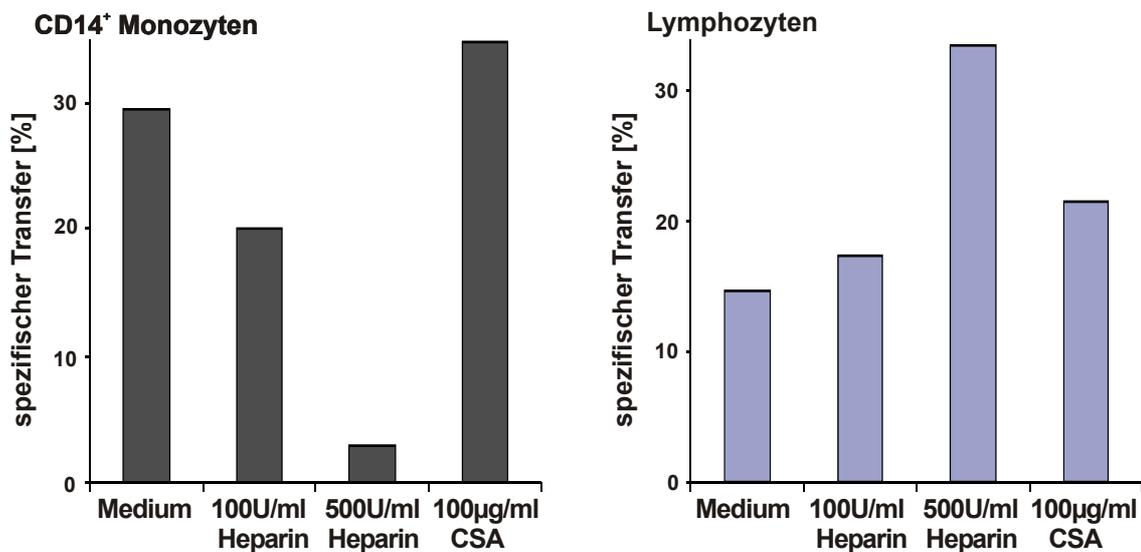


Abbildung 5.24: Spezifischer Mikropartikel-Transfer in Gegenwart von Heparin und Chondroitinsulfat A. Heparin reduziert den Transfer auf CD14⁺ Monozyten und verstärkt den Transfer auf Lymphozyten, wenn sowohl PBMCs als auch Donorzellen mit Heparin inkubiert waren. Chondroitinsulfat A zeigt nur eine geringfügige Veränderung der Mikropartikel-Aufnahme im Vergleich zur Medium-Kontrolle.

Eine Reduktion des Transfers von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten wurde schon durch eine Konzentration von 100 U/ml Heparin erreicht, bei 500 U/ml zeigte sich sogar eine 90 %ige Hemmung (Abbildung 5.23 und Abbildung 5.24).

Jedoch müssen hierfür sowohl die Mikropartikel freisetzenden Kato-Zellen, als auch die aufnehmenden PBMCs mit Heparin inkubiert sein. Waren nur die Donorzellen oder die Akzeptorzellen mit den entsprechenden Zusätzen vorinkubiert, so zeigte sich keine Veränderung im Transfer verglichen mit der Mediumkontrolle (Abbildungen nicht dargestellt). Durch Chondroitinsulfat A konnte der Transfer auf Monozyten nicht beeinflusst werden. Bei den Lymphozyten hingegen wurde der Transfer im Vergleich zum Medium durch Heparin verstärkt; Chondroitinsulfat A hat auch hier nur eine geringe positive Auswirkung auf die Übertragung von Mikropartikeln.

Wie bei den vorherigen Versuchsansätzen wird auch bei diesem Experiment deutlich, dass sich die Monozyten und Lymphozyten bei der Mikropartikel-Aufnahme unterschiedlich verhalten.

5.3.6 Bedeutung der Thiol-Gruppen beim Transfer

Bei der Analyse verschiedener Fusionsprozesse hat sich herausgestellt, dass diese im Prinzip sehr ähnlich ablaufen und zwar nicht nur während der Endozytose, sondern auch bei anderen vesikulären Transportvorgängen. Ein am intra-Golgi-Transport beteiligtes Protein, das NSF (N-ethylmaleimid sensitiver Faktor) (Balch et al., 1984), wurde auch als essentieller Faktor bei Fusionsvorgängen zwischen endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat, bei Endosomenfusionen und der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran, identifiziert (Beckers et al., 1989); (Diaz et al., 1989).

N-ethylmaleimid (NEM) ist ein Sulfhydryl-Reagenz, das aufgrund seiner Eigenschaft Cysteinreste chemisch zu modifizieren, hauptsächlich für Proteinstruktur-Analysen eingesetzt wird. Im Hinblick auf die Fähigkeit mit Thiol-Gruppen zu reagieren, kann NEM aber auch zahlreiche Enzyme inaktivieren und zeigt eine starke Inhibition der Endo- und Exozytose. Annexin-Tetramere werden z. B. durch NEM dosisabhängig an der Liposomaggregation gehemmt und durch den Verlust der Sulfhydryl-Gruppen an der Membranfusion gehindert (Singh and Liu, 2000).

Im Gegensatz zu NEM ist Quecksilberchlorid (HgCl_2) ein spezifisches Thiol-Reagenz (Kosower et al., 1969). Durch diese zell-penetrierenden Sulfhydryl-Reagenzien wird die Glykolyse, der Glucose-Transport und der Aufbau von Mikrotubuli inhibiert, hingegen die Zellpermeabilität erhöht (Tsan et al., 1976); (Oliver et al., 1976).

5.3.6.1 Einfluss von N-ethylmaleimid auf den Transfer

Um die Auswirkung von NEM auf den Mikropartikel-Transfer zu untersuchen wurden PBMCs als Akzeptorzellen und Dil gefärbte Kato-Zellen als Donorzellen getrennt voneinander mit 0,1 mM bzw. 1 mM NEM für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach mehrmals gewaschen. Die Koinkubation wurde in Medium ausgeführt. Auch hier wurden die $CD14^+$ Monozyten mit α CD14-APC markiert um sie durchflußzytometrisch auszuwerten. Die Lymphozyten-Population wurde anhand ihrer Größe und Granularität im FACS eingegrenzt.

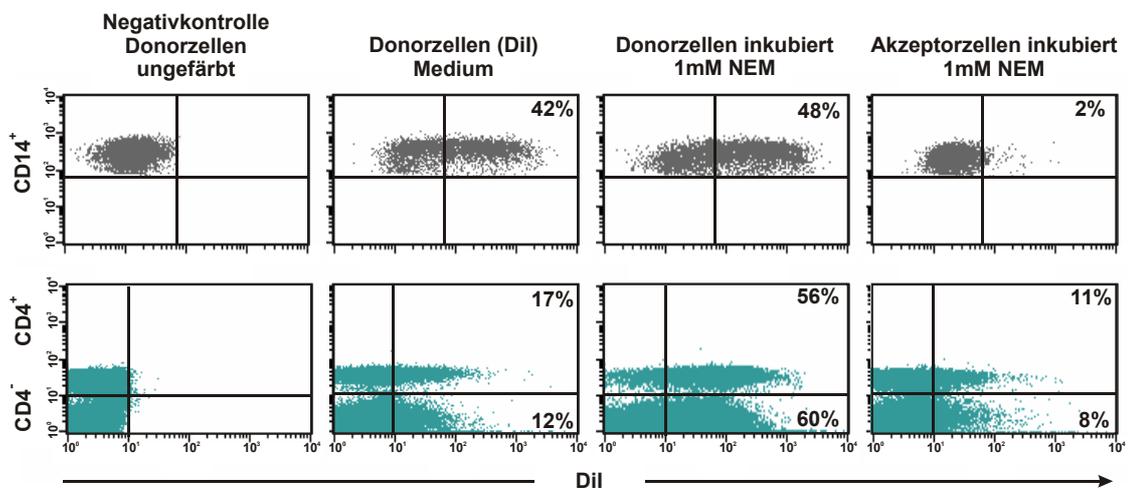


Abbildung 5.25: FACS-Analyse des Transfer von Mikropartikeln nach Behandlung der Donor- bzw. Akzeptorzellen mit N-ethylmaleimid (NEM). Die Plots zeigen den Transfer auf $CD14^+$ Monozyten (oben) und Lymphozyten (unten), nachdem entweder die Mikropartikel bildenden Kato-Zellen (Donorzellen) oder die Akzeptorzellen (PBMCs) mit 1 mM NEM für 5 min inkubiert und vor der Koinkubation gewaschen wurden.

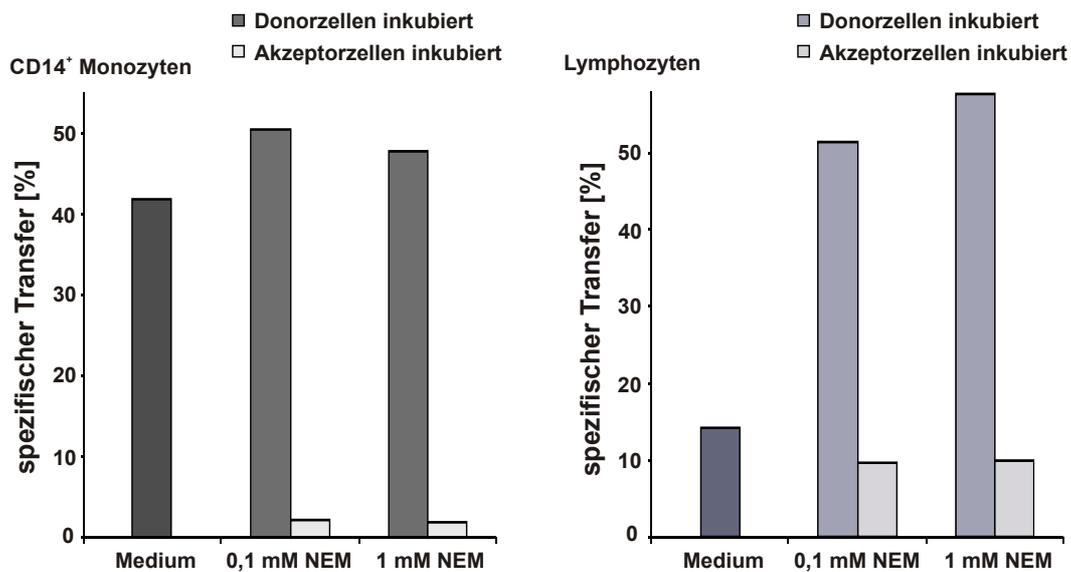


Abbildung 5.26: Hemmung des Mikropartikel-Transfers durch N-ethylmaleimid. PBMCs und Kato-Zellen wurden einzeln mit 0,1 mM bzw. 1 mM NEM für 5 min inkubiert und in Medium koinkubiert. Der Transfer auf Monozyten (links) wurde ausschließlich durch Inkubation der Akzeptorzellen reduziert. Lymphozyten (rechts) zeigten eine verstärkte Aufnahme von Mikropartikeln nach NEM-Inkubation der Donorzellen, der Transfer änderte sich nur gering nach Inkubation der PBMCs. Das Diagramm zeigt exemplarische Ergebnisse aus 3 vergleichbaren Resultaten.

Wie Abbildung 5.26 zeigt, wurde die Aufnahme von Mikropartikeln durch CD14⁺ Monozyten schon durch 0,1 mM NEM fast komplett verhindert, wenn die Akzeptorzellen mit NEM präinkubiert wurden. Hingegen führte die Präinkubation der Donorzellen nicht zu einer Verstärkung des Transfers. Der spezifische Transfer bei Lymphozyten wurde durch Inkubation der Donorzellen mit NEM verstärkt, durch Inkubation der PBMCs nur leicht gehemmt.

Analog den Versuchen mit Cytochalasin D (5.3.2), Ca²⁺-Inhibitoren (5.3.4) und Annexin V (5.3.3) zeigte sich auch bei diesem Versuch eine unterschiedliche Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten und Lymphozyten. Dass Monozyten durch NEM an der Aufnahme von Mikropartikeln gehindert werden deutet auf einen aktiven Fusionsprozess an der Monozytenmembran hin.

Die starke Hemmung des Transfers durch NEM wurde auch bei der Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet. PBMCs wurden mit dem Membranfarbstoff DiO gefärbt und mit 1 mM NEM inkubiert. Nach der Koinkubation mit CM-Dil gefärbten Kato-Zellen in Medium wurden die Monozyten mit magnetischen CD14-Micro Beads isoliert. Zur Kontrolle wurde parallel ein Transfer mit unbehandelten PBMCs durchgeführt.

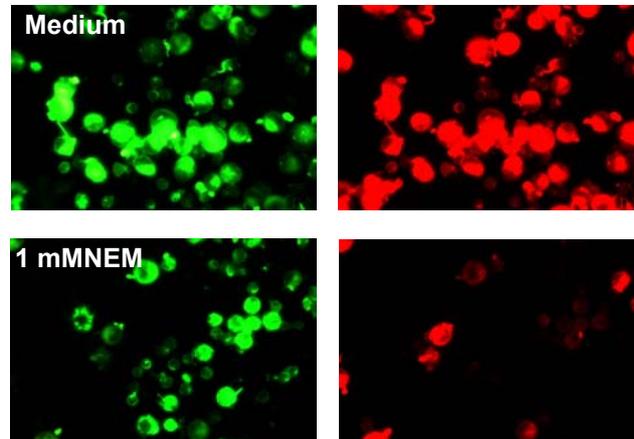


Abbildung 5.27: Fluoreszenz-Mikroskopie des Transfers mit N-ethylmaleimid. $CD14^+$ Monozyten wurden mit dem Membranfarbstoff DiO gefärbt (links). Rechts sind die Monozyten nach der Aufnahme CM-Dil markierter Mikropartikel zu sehen. Nach Inkubation mit NEM (unten) haben deutlich weniger Monozyten rot gefärbte Mikropartikel aufgenommen.

Die fluoreszenz-mikroskopische Abbildung 5.27 zeigt deutlich, dass durch den Einfluss von 1 mM NEM die Zahl an Monozyten, die CM-Dil markierte Mikropartikel aufgenommen haben, im Vergleich zur Medium-Kontrolle reduziert wurde.

5.3.6.2 Einfluss von Quecksilberchlorid

In folgendem Experiment wurden die PBMCs vor der Koinkubation 15 min mit Quecksilberchlorid (HgCl_2) vorbehandelt und danach gewaschen. Die Koinkubation erfolgte mit markierten Kato-Zellen als Donorzellen in Medium.

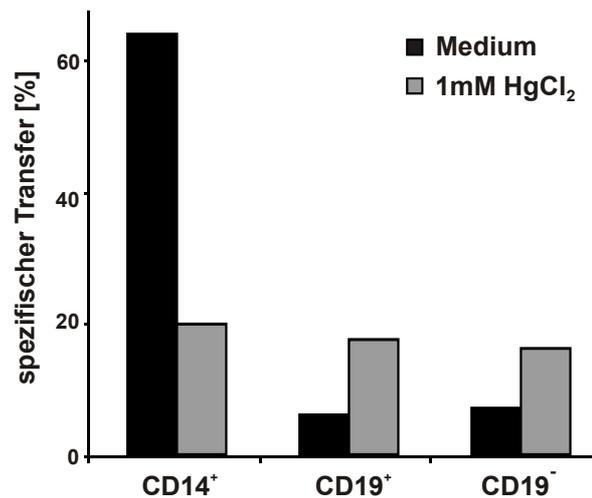


Abbildung 5.28: Beeinflussung des Transfers durch Inkubation der PBMCs mit 1 mM HgCl_2 . Bei den CD14⁺ Monozyten wurde der Transfer durch HgCl_2 gehemmt, während der Transfer auf CD19⁺ B-Zellen anstieg.

Der spezifische Mikropartikel-Transfer auf CD14⁺ Monozyten wurde durch Quecksilberchlorid um 70 % inhibiert. Diese Hemmung ist irreversibel, da nach Vorinkubation der Akzeptorzellen (PBMCs) mit HgCl_2 die Zellen mehrmals gewaschen wurden und der Transfer dennoch beeinträchtigt war. Die CD19⁺ B-Zellen und Lymphozyten dagegen zeigten eine gering vermehrte Aufnahme der Mikropartikel nach Inkubation mit dem Thiol-Reagenz.

Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass es sich bei der Mikropartikel-Aufnahme durch CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen um zwei differente Mechanismen handelt und legen nahe, dass NEM im Falle von Monozyten möglicherweise auch über Reaktion mit Thiol-Gruppen wirkt.

5.3.7 Bedeutung von SNARE-Molekülen beim Transfer von Mikropartikeln

Proteine der SNARE-Familie sind im Allgemeinen am inter- und intrazellulären Vesikel-Transport (z. B. bei der Sekretion und Endozytose von Vesikeln, in Endosomen und Lysosomen) beteiligt. Der SNARE-Komplex einer chemischen Synapse dient hauptsächlich der Membranfusion synaptischer Vesikel mit der synaptischen Membran (Weber et al., 1998). Auch während der Phagozytose unterstützen SNARE-Moleküle die Erneuerung der Zellmembran. SNAREs sind kleine membrangebundene Proteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden: v-SNAREs, die mit der vesikulären Membran assoziiert sind und t-SNAREs, die sich auf der Zielmembran (*targetmembrane*) finden.

5.3.7.1 Einfluss von Tetanus und Botulinum Neurotoxin

Viele Proteine der SNARE-Familie sind gegen clostridiale Neurotoxine empfindlich. Die Neurotoxine modifizieren die Anordnung des SNARE-Komplexes, indem sie die Stabilität reduzieren und den zytoplasmatischen Teil von der Membranverankerung lösen (Schiavo et al., 1994). Tetanus-Toxin und Botulinum-Toxin B spalten VAMP (Synaptobrevin), während Botulinum-Toxin C Syntaxin und Botulinum-Toxin A SNAP-25 spaltet. SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein*) ist auf Plasmamembranen verankert und gehört zur Gruppe der t-SNAREs. Synaptobrevin, das auch als VAMP (*vesicle associated membrane protein*) bezeichnet wird, gehört zu den v-SNAREs und ist maßgeblich an Membranfusionen beteiligt. Mittels Antikörper gegen VAMP I und VAMP II wurde die Expression dieser v-SNAREs auf Monozyten, Lymphozyten und Mikropartikel bildenden Donorzellen untersucht (Daten nicht gezeigt). Eine VAMP I-Expression konnte dabei ausschließlich auf Monozyten festgestellt werden. Experimente, bei denen dieser VAMP I-Antikörper auf Monozyten eingesetzt wurde, zeigten keine Beeinträchtigung des Mikropartikel-Transfers (Daten nicht gezeigt).

In folgendem Experiment wurden die Neurotoxine Tetanus-Toxin und Botulinum-Toxin A verwendet, um den Einfluss von VAMP und SNAP-25 beim Mikropartikel-Transfer zu untersuchen. Dazu wurden sowohl die Donorzellen, als auch die Akzeptorzellen mit jeweils beiden Toxinen 18 h vorinkubiert und danach für den Transfer koinkubiert.

Tabelle 5.2: Hemmung des spezifischen Transfers durch Tetanus-Toxin (TeNT) bzw. Botulinum-Toxin A (BoNT A). Nach Inkubation der Donor- und Akzeptorzellen für 18 h mit den Toxinen wurde der Transfer von Mikropartikeln auf CD14⁺ Monozyten, B-Zellen und CD19⁻ Lymphozyten per FACS analysiert.

Zellart	Hemmung des spezifischen Transfers [%] durch	
	TeNT (100 ng/ml)	BoNT A (100 ng/ml)
CD14 ⁺ Monozyten	0	13,6
CD19 ⁺ B-Zellen	1,7	12,6
CD19 ⁻ Lymphozyten	3,7	7,8

Da sowohl die Akzeptor- als auch die Donorzellen nach der Inkubation mit höheren Konzentrationen an Toxinen in vielen Versuchsansätzen bei der FACS-Analyse als nicht mehr vitale Zellen identifiziert werden konnten, wurden nur Ansätze mit 100 ng/ml Toxin ausgewertet (Tabelle 5.2). Hierbei zeigte sich, dass die Mikropartikel-Aufnahme durch CD14⁺ Monozyten und Lymphozyten durch Tetanus-Toxin, welches VAMP-Moleküle spaltet, nicht reduziert wurde. Botulinum-Toxin A hemmte den Transfer auf Monozyten und Lymphozyten nur in geringerem Maße bei einer Konzentration von 100 ng/ml.

5.3.8 Bedeutung der Tetraspanine beim Mikropartikel-Transfer

Tetraspanine sind Organisatoren multimolekularer Komplexe und werden auf vielen Zellen exprimiert. Eine ihrer wesentlichen Funktionen ist die Regulierung von Fusions-Prozessen, z. B. bei der Oozyten-Spreien-Verschmelzung, Muskelzell-Fusion oder bei der virus-induzierten Synzytiums-Formation.

Gegen einige dieser Tetraspanin-Moleküle gibt es blockierende Antikörper, die diese Prozesse unterbinden. Um zu untersuchen, ob die an Membranfusionen beteiligten Tetraspanin-Moleküle auch den Transfer von Mikropartikeln bestimmen, wurden diese blockierenden Antikörper für Transfer-Experimente herangezogen. PBMCs und Kato-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD9 (Klon K41 und Klon BU16), CD63, CD81 (Klon JS64) und CD82 (Klon 50F11), sowie mit den jeweiligen Isotypkontrollen inkubiert und die Bindung dieser Antikörper mittels Sekundäantikörper im FACS analysiert.

Tabelle 5.3: Nachweis von Tetraspaninen auf Zelloberflächen. PBMCs und Kato-Zellen wurden mit den Tetraspanin-Antikörpern und den entsprechenden Isotyp-Antikörpern inkubiert und die Expression der Moleküle im FASC bestimmt. ++ starke Expression, + schwache Expression.

Zellart	Expression von Tetraspaninen [Mean]				
	α CD9 ¹⁾	α CD9 ²⁾	α CD63	α CD81	α CD82
Monozyten	++	++	+	+	+
Lymphozyten	+	+	+	+	+
Kato-Zellen	++	++	++	++	++

1) Klon K41; 2) Klon BU16

Die Bindungsanalysen in Tabelle 5.3 zeigen, dass alle untersuchten Tetraspanine auf Monozyten, Lymphozyten und Kato-Zellen vorkommen. Eine starke Expression von CD9 ist auf Monozyten und Kato-Zellen, jedoch eine schwächere Expression auf Lymphozyten zu beobachten. Dagegen binden Antikörper gegen CD63, CD81 und CD82 besonders gut auf Kato-Zellen und in geringerem Maße auf PBMCs.

Nachdem die Expression der Tetraspanine auf den PBMCs und Kato-Zellen positiv war, wurden als nächstes die blockierenden Eigenschaften dieser Antikörper im Transfer-Experiment analysiert. Die Donorzellen (Dil gefärbte Kato-Zellen) und PBMCs als Akzeptorzellen wurden mit den Antikörpern inkubiert und dann für die Übertragung der Mikropartikel koinkubiert.

Tabelle 5.4: Einfluss von Tetraspanin- Antikörpern auf den Mikropartikel-Transfer. PBMCs und Kato-Zellen wurden mit α CD9 (Klon K41 und BU16), α CD63 (Klon), α CD81 (Klon), α CD81 (mAb 217) und entsprechenden Isotypkontrollen präinkubiert und dann koinkubiert. Eine Hemmung (-) oder eine Verstärkung (+) des Transfers wurden im FACS für CD14⁺ Monozyten, CD19⁺ B-Zellen und CD19⁻ Lymphozyten bestimmt. Die Tabelle zeigt exemplarische Ergebnisse aus je 3-4 vergleichbaren Resultaten.

Zellart	Hemmung (-) und Verstärkung (+) des spezifischen Transfers [%] durch				
	α CD9 ¹⁾	α CD9 ²⁾	α CD63	α CD81	α CD82
CD14 ⁺ Monozyten	-3	+1	+35	+9	-10
CD19 ⁺ B-Zellen	-20	+20	+23	+42	-21
CD19 ⁻ Lymphozyten	-18	+14	+22	+14	-19

1) Klon K41; 2) Klon BU16

Die FACS-Analysen des spezifischen Transfers (Tabelle 5.4) zeigten, dass die Antikörper gegen CD9 nur geringe Auswirkungen auf die Vesikel-Aufnahme durch CD14⁺ Monozyten und Lymphozyten hatten. Durch α CD63 wurde der Transfer auf allen PBMC-Populationen erhöht, durch α CD81 nur auf den Lymphozyten. Der Antikörper gegen CD82 offenbarte nur eine geringe blockierende Wirkung. Grundsätzlich ist aus diesen Versuche keine eindeutige Beteiligung der untersuchten Tetraspanine am Mikropartikel-Transfer zu erkennen.

5.4 Serum und Komplement

5.4.1 Transfer von Mikropartikeln auf Vollblut

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten den Transfer von Mikropartikeln auf isolierte Monozyten und Lymphozyten in Gegenwart von Medium. Als nächstes wurde der Transfer auf Monozyten und Lymphozyten unter physiologischeren Bedingungen in Gegenwart von Serum/Plasma untersucht. Dazu wurde der Transfer von Mikropartikeln in Vollblut durchgeführt. Dil markierte Kato-Zellen wurden mit isolierten PBMCs in Medium bzw. mit Vollblut des gleichen Spenders koinkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse des Vollbluts wurden die Proben zur FACS-Analyse anschließend für die Monozyten mit α CD14-APC markiert, für die B-Zellen mit α CD19-FITC.

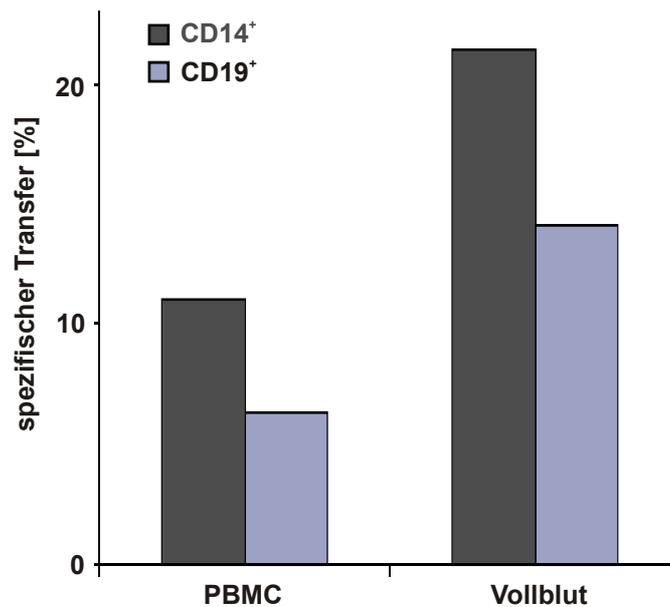


Abbildung 5.29: Spezifischer Transfer von Mikropartikeln auf isolierte PBMCs und Vollblut. Dil gefärbte Kato-Zellen wurden mit isolierten PBMCs bzw. Vollblut koinkubiert. Der Transfer auf CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ Lymphozyten aus Vollblut ist im Vergleich zu PBMCs verstärkt.

Nach der Koinkubation erreichte der spezifische Transfer von CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen in Vollblut im Vergleich zu isolierten PBMCs eine um 40 % verstärkte Aufnahme von Mikropartikeln.

5.4.2 Einfluss von Serum auf den Transfer von Mikropartikeln

Nachdem der Mikropartikel-Transfer durch Vollblut deutlich erhöht war, wurde nun versucht den Faktor, der für diesen Effekt verantwortlich ist, zu analysieren. Zunächst wurde der Transfer von Dil markierten Mikropartikeln auf isolierte PBMCs in Medium und Serum durchgeführt. Das Serum wurde hierzu frisch aus Vollblut präpariert und sowohl die PBMCs, als auch die Kato-Zellen bzw. Mikropartikel wurden damit 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vor der Koinkubation nicht gewaschen, um zu gewährleisten, dass der putative Serumfaktor permanent vorhanden ist.

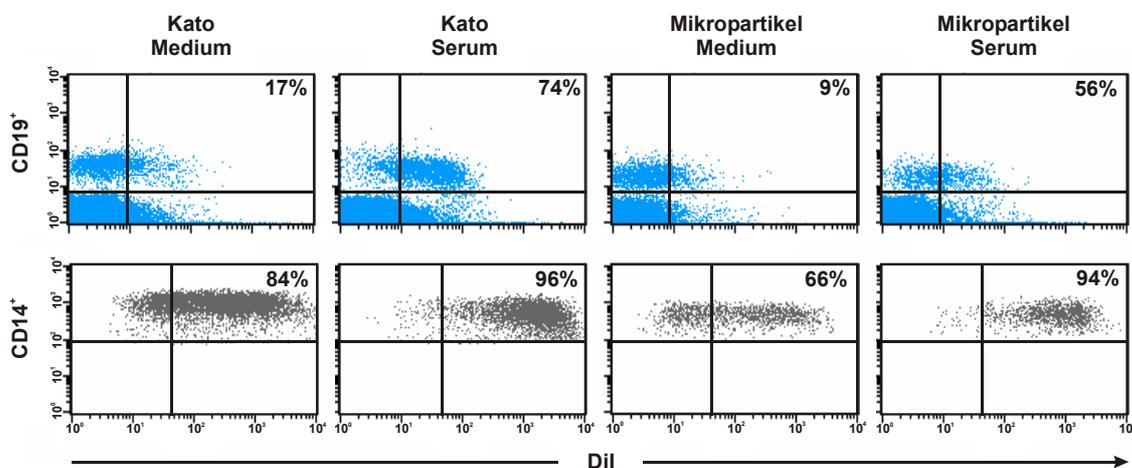


Abbildung 5.30: FACS-Analyse des Mikropartikel-Transfer mit Serum. Dil markierte Kato-Zellen bzw. Mikropartikel und PBMCs wurden vor dem Transfer mit konzentriertem Serum inkubiert und ohne zu waschen koinkubiert. Im Vergleich zum Medium-Transfer war der Serum-Transfer bei Monozyten und Lymphozyten deutlich verstärkt.

Wie die FACS-Analyse des Transfers auf CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen in Abbildung 5.30 darstellt, wurde die verstärkende Aufnahme, die bei Vollblut beobachtet wurde, auch durch Serum hervorgerufen. Der Mikropartikel-Transfer auf CD19⁺ B-Zellen erhöhte sich durch Serum von 17 % auf 74 % mit Kato-Zellen und von 9 % auf 56 % mit isolierten Mikropartikeln. Bei den CD14⁺ Monozyten war der Transfer schon hoch, konnte durch Serum dennoch gesteigert werden.

Um die Bedeutung des erhöhten Transfers durch Serum zu verifizieren wurde im folgenden Experiment untersucht, ob das Serum die Akzeptorzellen oder die Donorzellen beeinflusst und ob der Effekt reversibel ist. Für den Versuch wurden die PBMCs und Kato-Zellen getrennt voneinander mit unverdünntem Serum bzw. Medium für 30 min vorinkubiert. Vor der Koinkubation wurde ein Teil der Zellen gewaschen, um ungebundene Serum-Faktoren zu entfernen. Der

Transfer dieser Zellen wurde anschließend in Medium durchgeführt. Die nicht gewaschenen Zellen wurden direkt zusammen pipettiert und in Serum koinkubiert.

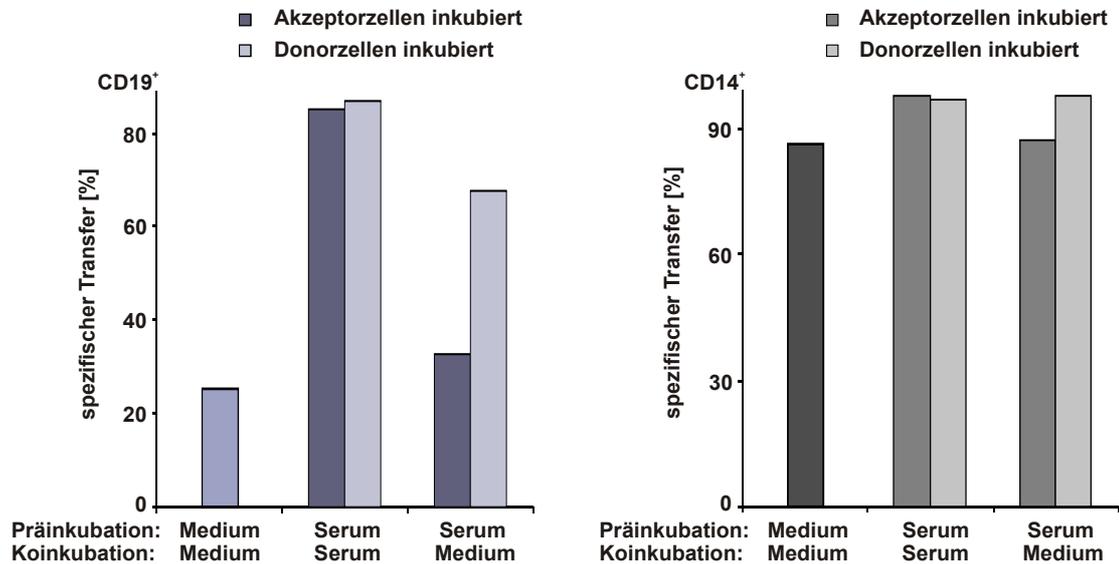


Abbildung 5.31: Spezifischer Transfer mit Serum. Akzeptor- und Donorzellen wurden getrennt voneinander mit Serum bzw. Medium inkubiert und vor dem Transfer gewaschen bzw. nicht gewaschen. Die CD14⁺ Monozyten (rechts) zeigten nur einen geringen Effekt durch Serum, die CD19⁺ Lymphozyten nahmen in Anwesenheit von Serum verstärkt Mikropartikel auf. Auch die Präinkubation der Donorzellen führte zur verstärkten Mikropartikel-Aufnahme, während sich der Transfer durch Inkubation der PBMCs und anschließendes Entfernen des Serums nicht verstärken lässt.

Die FACS-Analyse des Mikropartikel-Transfers zeigte nur einen geringen Einfluss von Serum auf die Vesikel-Aufnahme durch CD14⁺ Monozyten (Abbildung 5.31, rechts). Beim Transfer auf CD19⁺ B-Zellen hingegen ist zu erkennen, dass nach Inkubation der PBMCs mit Serum der Transfer auf das Ausgangsniveau zurückgeht, wenn während der Koinkubation das Serum nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 5.31, links).

Dieses Experiment zeigte, dass der Transfer-verstärkende Serum-Effekt nur dann auftritt, wenn die Donorzellen mit Serum inkubiert wurden. Ebenso demonstriert dieser Versuch, dass sich der erhöhte Transfer durch Waschen der Kato-Zellen nicht reduzieren lässt, woraus man schließen kann, dass die Serum-Faktoren irreversibel an die Mikropartikel gebunden sind.

5.4.3 Transfer mit verschiedenen Serum-Konzentrationen

Die Bestandteile des Blutserums sind sehr heterogen; es besteht eine Vielfalt von mehr als hundert verschiedenen molekularen Spezies. Blutserum besteht zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus gelösten Substanzen, von denen wiederum die Proteine 70 %, niedermolekulare Stoffe 20 % und Elektrolyte 10 % ausmachen. Die quantitativ wichtigsten Fraktionen der Proteine im Serum sind Albumin (ca. 52 %), α_1 - und α_2 -Globuline (ca. 11 %), β -Globuline (ca. 12 %) und γ -Globuline (ca. 14 %). Neben den Plasmaproteinen finden sich im Serum unterschiedlichste Hormone und Nährstoffe, sowie Komplementkomponenten, Stoffwechselendprodukte, Elektrolyte und organische Säuren.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, in welcher Verdünnung der putative Serum-Faktor, der für die Transferverstärkung verantwortlich ist, noch wirksam ist. Frisch präpariertes Serum wurde unverdünnt, sowie in einer Verdünnungsreihe, die mit Medium angesetzt wurde, eingesetzt.

Die gesteigerte Aufnahme der Mikropartikel durch unverdünnt eingesetztes Serum ist bei den B-Zellen besonders gut zu erkennen. Bei einer Verdünnung von 1:800 ist der Effekt zwar schon abgeschwächt, aber noch nachweisbar (Abbildung 5.32). Für Monozyten zeigte sich eine vergleichbare Tendenz, jedoch war der Effekt hier nicht so dominant (Abbildung nicht dargestellt).

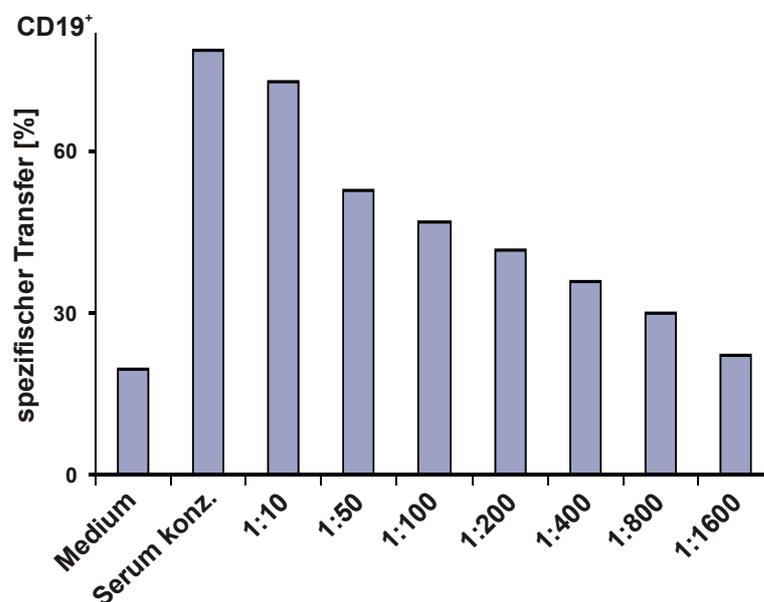


Abbildung 5.32: Mikropartikel-Transfer auf CD19⁺ B-Zellen mit verschiedenen Serum-Konzentrationen. Dil gefärbte Kato-Zellen wurden mit konzentriertem Serum und verschiedenen Verdünnungen von Serum in Medium inkubiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei dem Serumfaktor um ein Protein handelt, das in einer relativ hohen Konzentration im Blutserum vorliegt, da der putative Faktor selbst bei starker Verdünnung noch den Transfer erhöht. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Transfer durch ein Serumprotein beeinflusst wird, das eine intensive Wirkung hat und auch in sehr niedriger Dosis die Mikropartikel-Aufnahme verstärkt.

5.4.4 Transfer mit verschiedenen Serum-Fractionen

Um den für die durch Serum erhöhte Aufnahme von Mikropartikeln verantwortlichen Faktor zu ermitteln, wurde als nächstes das Serum durch verschiedene Filter in einzelne Fraktionen unterteilt. Dafür wurden Filtertubes eingesetzt, die für Bestandteile mit einer relativen Molekülmasse von 100 kDa, 30 kDa bzw. 3 kDa durchlässig sind. Je 1 ml Serum wurde auf die Filter aufgetragen und 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Sowohl die Serum-Filtrate als auch die Überstände der Filtration wurden dann für den Transfer eingesetzt.

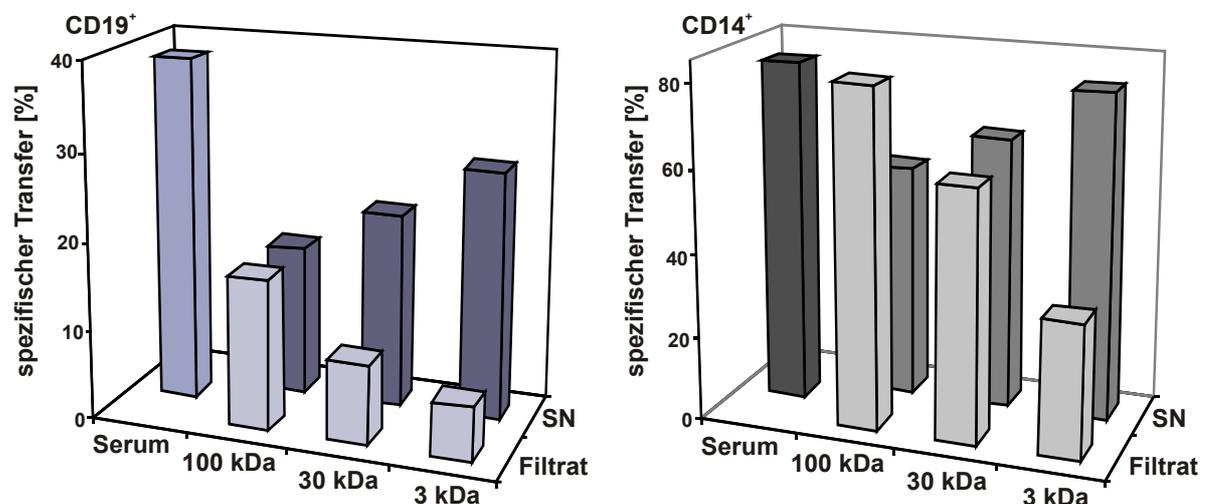


Abbildung 5.33: Transfer mit verschiedenen Serum-Fractionen. Für die Filtration des Serums wurden Filterröhrchen mit 3 kDa, 30 kDa und 100 kDa eingesetzt. Die Filtrate und die Überstände (SN) wurden für die Koinkubation der PBMCs mit Dil gefärbten Kato-Zellen eingesetzt. Das linke Diagramm zeigt den Transfer auf CD19⁺ B-Zellen, das rechte auf CD14⁺ Monozyten. In den Überständen (SN) sind jeweils Fragmente, die größer als die Filterporen sind, in den Filtraten befinden sich Moleküle, die kleiner als die Poren sind.

Wie die FACS-Analyse der Serum-Fractionen in Abbildung 5.33 darlegt, ist der spezifische Transfer von Mikropartikeln auf CD19⁺ B-Zellen beim 100 kDa Filtrat vergleichbar mit dem 100 kDa Überstand. Der Transfer des Filtrats mit < 30 kDa war schon deutlich geringer als der Transfer mit dem gesamten Serum. Die Serumfraktion < 3 kDa zeigte jedoch einen eindeutig verminderten Transfer, hingegen die Fraktion mit Serumproteinen, die > 3 kDa sind, einen erhöhten Transfer. Daraus kann man schließen, dass die relative Molekülmasse des gesuchten Faktors größer als 3 kDa ist. Analog den B-Zellen ist die Mikropartikel-Aufnahme der CD14⁺ Monozyten durch die Serum-Fractionen in derselben Weise beeinflusst. Folglich liegt die relative Molekülmasse des putativen Faktors, der für den erhöhten Serum-Transfer verantwortlich ist, zwischen 3 kDa und 30 kDa. Die relative Molekülmasse von Albumin liegt bei 68 kDa, die der Globuline zwischen 90 kDa und 1300 kDa. Durch die FACS-Analyse mit den Serum-Fractionen lassen sich somit Einflüsse auf den Transfer durch Albumine und Globuline, aber auch durch Antikörper (ca. 160 kDa) ausschließen.

5.4.5 Transfer mit Hitze-inaktiviertem Serum

Aufgrund der enormen Vielfalt an Serumproteinen, die in einen Bereich zwischen 30 kDa und 3 kDa fallen, kann die Analyse sehr aufwändig werden. Für die Identifizierung des putativen Serum-Faktors wurden als nächstes einzelne Fractionen von Serumproteinen genauer untersucht. Ein wichtiger Bestandteil des Blutserums stellt das Komplementsystem dar, welches eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen und der Immunantwort spielt. Komplementkomponenten sind hitzeempfindliche Bestandteile des normalen Blutserums und setzen sich aus mehr als 30 Serum- und Membranproteinen zusammen.

Um eine Beteiligung von Komplementkomponenten bei der verstärkten Mikropartikel-Aufnahme durch Serum zu untersuchen, wurde die Aktivität der Komplementproteine unterbunden. Für das folgende Experiment wurde frisch isoliertes Serum für 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert und für die Inkubation der Donorzellen verwendet.

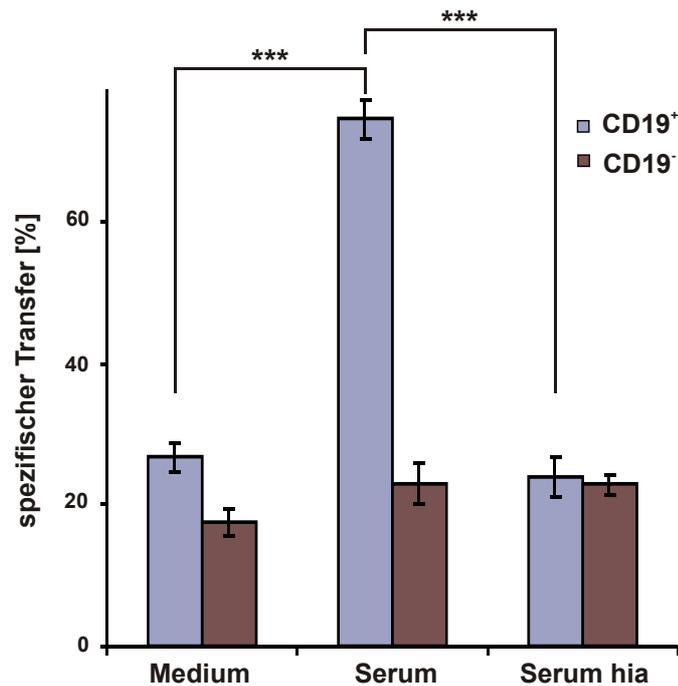


Abbildung 5.34: Spezifischer Transfer mit Hitze-inaktiviertem Serum. Zur Inaktivierung der Komplementproteine im Serum wurde dieses 30 min bei 56°C inkubiert. Donorzellen wurden mit konzentriertem Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum inkubiert und anschließend für die Koinkubation mit PBMCs eingesetzt. Das Diagramm zeigt den Transfer auf CD19⁺ B-Zellen und CD19⁻ Lymphozyten. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM des spezifischen Transfers (**p<0,001 gegen die Medium-Kontrolle bzw. den Serum-Transfer, n=3).

Der spezifische Transfer in Abbildung 5.34 zeigte deutlich einen verstärkten Transfer durch konzentriertes Serum auf CD19⁺ B-Zellen. Der gesteigerte Transfer durch Serum war für CD19⁺ B-Zellen ($p<0,001$) statistisch signifikant. Die Inkubation der Kato-Zellen mit Serum hat keinen Einfluss auf CD19⁻ Lymphozyten. Der spezifische Transfer auf B-Zellen mit Hitze-inaktiviertem Serum reduzierte den Serum-Transfer wieder auf das Ausgangsniveau mit Medium ($p<0,001$).

Der durch Serum ausgelöste erhöhte Transfer kann offensichtlich durch Hitze inaktiviert werden, woraus eine Beteiligung der hitzeempfindlichen Komplementkomponenten anzunehmen ist.

Zusätzlich zu den CD19⁺ B-Zellen sind in diesem Experiment zum Vergleich auch CD19⁻ Lymphozyten herangezogen worden, bei denen sich keine erhöhte Mikropartikel-Aufnahme durch Serum nachweisen lässt.

Die fluoreszenz-mikroskopischen Darstellungen des Transfers mit Serum und Hitze-inaktiviertem Serum bestätigten die FACS-Analysen. Kato-Mikropartikel wurden mit dem stabilen Membranfarbstoff CM-Dil gefärbt und nach Inkubation in Medium, Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum zusammen mit PBMCs koinkubiert. Für die Mikroskopie wurden B-Zellen mit magnetischen CD19⁺ MicroBeads angereichert.

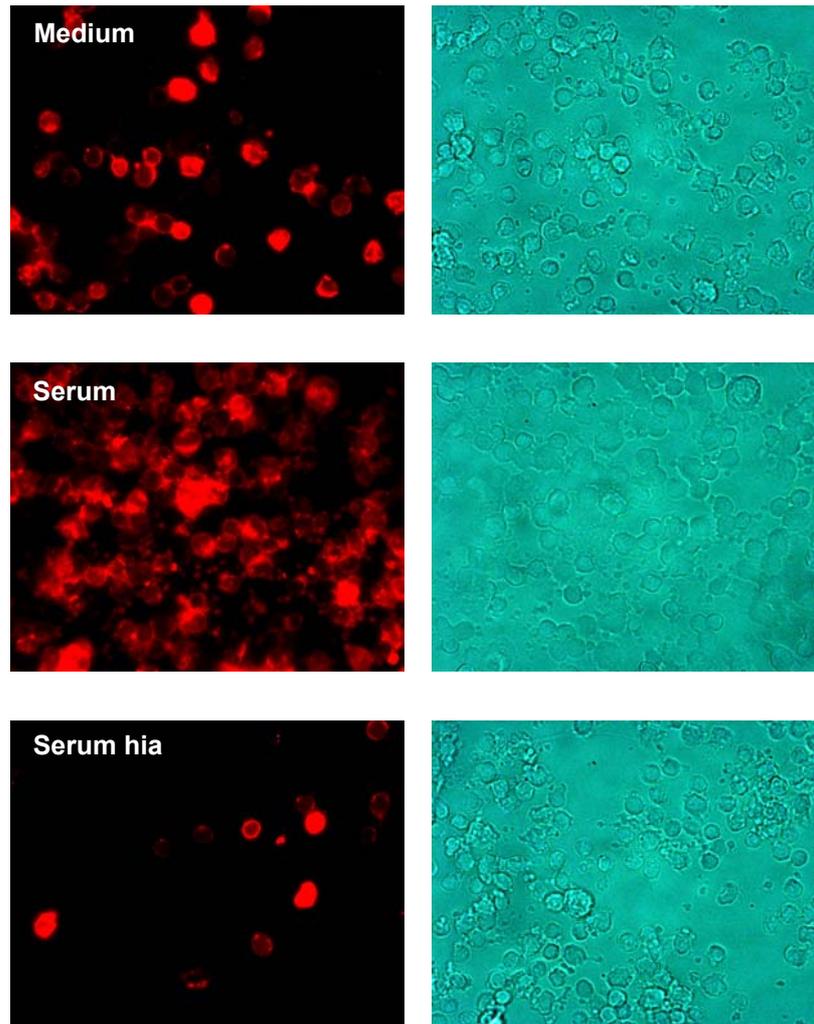


Abbildung 5.35: Fluoreszenz-mikroskopischer Nachweis des Transfers in Serum und Hitze-inaktiviertem (hia) Serum. CM-Dil markierte Kato-Mikropartikel wurden nach Inkubation in Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum mit PBMCs koinkubiert. Dargestellt sind die mit Micro Beads angereicherten B-Zellen.

Analog zu den FACS-Ergebnissen veranschaulichen die fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 5.35 den Transfer in Medium im Vergleich zu Serum, der deutlich erhöht wurde. Durch Hitze-inaktiviertes Serum wurde die Mikropartikel-Aufnahme durch CD19⁺ B-Zellen offensichtlich wieder auf das Ausgangsniveau reduziert.

5.4.6 Transfer mit komplement-depletiertem Serum

Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Plasmaproteinasen. Wird ein Komplementprotein direkt durch gebundene Antikörper aktiviert, so wird eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst, von denen jede zur Aktivierung der nächsten Komplementkomponente führt. Einige aktivierte Komplementproteine binden kovalent an Membranoberflächen und opsonieren diese so für die Aufnahme durch Zellen, die Komplementrezeptoren tragen. Die Effektorfunktionen können durch drei mögliche Verfahren aktiviert werden. Beim klassischen Weg geschieht dies durch eine Antikörperbindung an Antigene. Der Lektin-Weg wird durch Serumlektin, das an mannosehaltige Proteine oder Kohlenhydrate auf Bakterien oder Viren bindet, ausgelöst. Bindet eine spontan aktivierte Komplementkomponente an eine Pathogenoberfläche, so wird der alternative Weg ausgelöst (siehe Kapitel 1.3).

Für die Ermittlung des putativen Komplementproteins, das an der verstärkten Aufnahme von Mikropartikeln durch Serum beteiligt ist, wurden zunächst die ersten Komplementkomponenten der Kaskade in Betracht gezogen.

Die ersten Komplementkomponenten des klassischen Weges bilden den C1-Komplex, bestehend aus dem C1q-Molekül, das mit Antikörpermolekülen assoziiert, und je zwei aktivierenden Enzymen, C1r und C1s. In einer Reihe von proteolytischen Schritten werden dann die in der Kaskade folgenden Komplement-Faktoren C2 und C4 aktiviert. Die Serum-Komplementkomponente C3 ist das zentrale Protein der Komplement-Aktivierung, in der die drei Aktivierungswege zusammenlaufen.

Um die Komplementkomponente zu identifizieren, die den Serumeffekt des Transfers vermittelt, wurde Serum eingesetzt, bei dem Komplementproteine durch Immunoabsorption depletiert wurden (Calbiochem, La Jolla, USA). Für den Transfer-Versuch in folgendem Experiment wurde neben frisch isoliertem Serum aus Vollblut gesunder Spender auch kommerziell erhältliches Standard-Serum als Positivkontrolle herangezogen. Als Negativkontrolle diente das Serum nach Hitze-Inaktivierung und Medium.

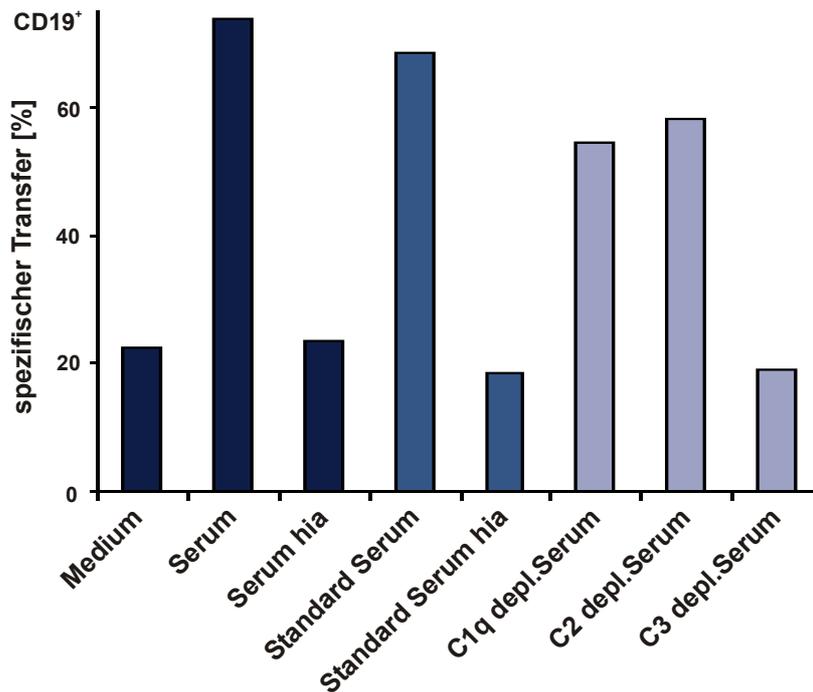


Abbildung 5.36: Transfer mit depletiertem Standard-Serum auf CD19⁺ Lymphozyten. Mikropartikel-sezernierende Kato-Zellen wurden mit Serum (konz.) und Hitze-inaktiviertem Serum (hia), sowie mit Komplementkomponenten-defizientem Serum (depl.) vorinkubiert und mit PBMCs koinkubiert.

Der Transfer von Mikropartikeln auf CD19⁺ Lymphozyten in Abbildung 5.36 veranschaulicht, dass im Vergleich zu normalem und Standard-Serum die Aufnahme der Mikropartikel durch C1q- und C2-defiziente Seren nur gering beeinflusst wurden. Allerdings ist durch C3-depletiertes Serum eine Reduktion des Transfers, ähnlich dem Transfer mit Hitze-inaktiviertem Serum, zu erkennen.

Aus diesem Experiment ist zu folgern, dass die Serum-Komplementkomponente C3, die eine zentrale Rolle bei der Komplement-Aktivierung spielt, entscheidend an der Verstärkung des Mikropartikel-Transfers beteiligt ist.

Im nächsten Schritt wurde den depletierten Seren die entsprechende Komplementkomponente in der Konzentration, wie sie in normalem humanem Blut vorliegt, zugegeben. Ebenso wurden die einzelnen Komplementproteine in Medium für den Mikropartikel-Transfer eingesetzt.

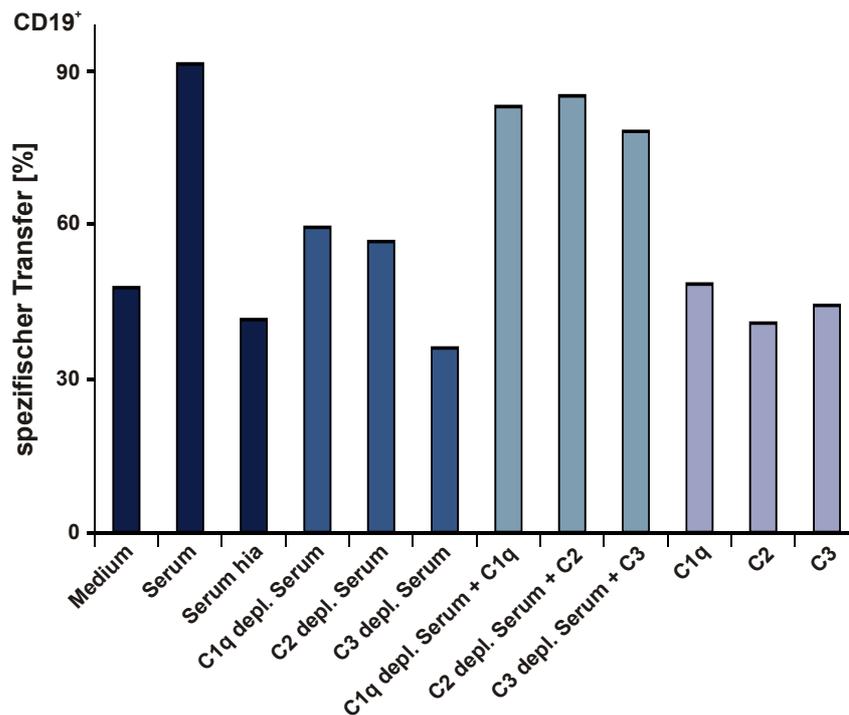


Abbildung 5.37: Mikropartikel-Transfer mit verschiedenen Komplementkomponenten auf CD19⁺ Lymphozyten. Die Vorinkubation der Dil markierten Donorzellen wurde mit depletiertem Serum, depletierten Seren, denen jeweils die Komplementkomponenten wieder zugeführt wurden und den einzelnen Komplementkomponenten in Medium durchgeführt. Die Komplementkomponenten wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: C1q mit 70 µg/ml, C2 mit 20 µg/ml, C3 mit 1mg/ml.

In Abbildung 5.37 ist der spezifische Mikropartikel-Transfer auf B-Zellen dargestellt. Durch die Zugabe der Komplementkomponenten wurde in allen drei Fällen der Effekt der depletierten Seren kompensiert und die verstärkte Vesikel-Aufnahme stellte sich wieder ein. Der Transfer, der durch C3 depletieretes Serum vermindert wurde, konnte hier durch Zugabe von 1 mg/ml C3 annähernd auf das Serumniveau erhöht werden. Die einzelnen Komplementproteine in Medium hatten keine Auswirkungen auf den Transfer, woraus man schließen kann, dass es nicht nur die Komplementkomponenten alleine sind, die den Transfer beeinflussen, sondern dass es sich wahrscheinlich um einen komplex ablaufenden Mechanismus mit mehreren Molekülen handelt.

Jedoch scheint C3, oder dessen Spaltprodukte eine maßgebliche Rolle beim Mikropartikel-Transfer zu spielen. Die Aktivierung von C3 erfolgt durch die C3 Konvertasen (C3bBb und C4bBb), die das C3 Molekül in ein C3a Fragment und ein C3b Fragment spalten. C3a löst lokale Entzündungsreaktionen aus, indem es Flüssigkeit, Zellen und Proteine an die Stelle der Infektion lockt. Im Gegensatz zu C3 besitzt das membranbindende Protein und Opsonin C3b eine Vielzahl von Bindungsstellen für andere Komplementproteine, -Rezeptoren oder -Regulatoren.

5.4.7 Transfer mit iC3b

Das erste Enzym des alternativen Komplementweges ist eine C3 Konvertase, die in geringem Maße spontan im Plasma entsteht und fortwährend in flüssiger Phase C3 in C3a und C3b spaltet. Die aktivierten Komplementkomponenten können potentiell alle Zellen zerstören, an die sie binden. Durch eine Reihe von komplementregulierenden Proteinen können Wirtszellen vor solch einer unbeabsichtigten Schädigung geschützt werden. C3b z. B. wird durch Faktor I in das inaktive Derivat iC3b gespalten. Es bleibt am Pathogen haften und wirkt dort als eigenständiges Opsonin, wenn es vom Komplementrezeptor CR2 oder CR3 gebunden wird und die Phagozytose stimuliert.

Auch apoptotische Zellen können sowohl den klassischen als auch den alternativen Komplementweg aktivieren. Durch Phosphatidylserin, das auf der Außenseite apoptotischer Zellen zu finden ist, aber auch zusätzlich durch iC3b, das an exponiertes Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen bindet, wird das Komplementsystem aktiviert (Verbovetski et al., 2002).

Wie in vorherigen Experimenten gezeigt wurde (Abbildung 5.31), wird der Transfer allein durch die Mikropartikel, die mit Serum inkubiert waren, verstärkt. Nachdem die Mikropartikel Phosphatidylserin auf der Außenseite präsentieren und iC3b an Phosphatidylserin bindet, wurde als nächstes iC3b als putativer Komplement-Faktor untersucht. Um die Beteiligung von iC3b am Transfer zu analysieren, wurde zunächst die Bindung von iC3b auf PBMCs, Donorzellen und den Mikropartikeln untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit Medium, Serum und Hitze-inaktiviertem Serum, wurde die iC3b-Bindung mit einem α iC3b-Antikörper (10 μ g/ml) und dem PE-markierten Sekundärantikörper R439 detektiert.

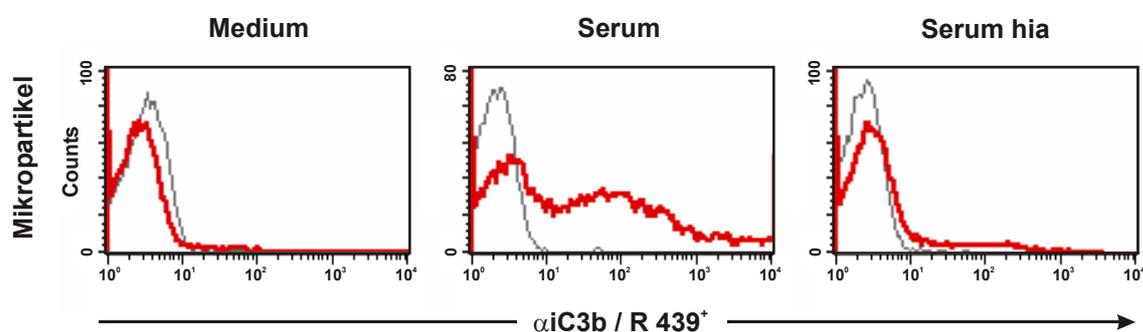


Abbildung 5.38: Histogrammanalyse von α iC3b auf Mikropartikeln. Die Mikropartikel wurden mit 10 μ g/ml iC3b-Antikörper (rote Linie) und 10 μ g/ml IgG2b als Isotypkontrolle (graue Linie) in Medium, Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum inkubiert.

Die FACS-Analyse in Abbildung 5.38 zeigt eine Bindung des α iC3b-Antikörpers auf Mikropartikeln nur nachdem sie unverdünntem Serum ausgesetzt waren. Eine Bindung nach Inkubation in Hitze-inaktiviertem Serum ist nicht mehr vorhanden.

Um herauszufinden, ob das iC3b auf den Mikropartikeln zu der verstärkten Aufnahme von Vesikeln führt, wurde versucht mit Hilfe eines α iC3b-Antikörpers das iC3b für den Transfer zu blockieren. Die Mikropartikel wurden zunächst mit Serum vorinkubiert um sie mit iC3b zu beladen und anschließend mit 10 μ g/ml α iC3b versetzt. Der Transfer auf PBMCs fand in Medium statt.

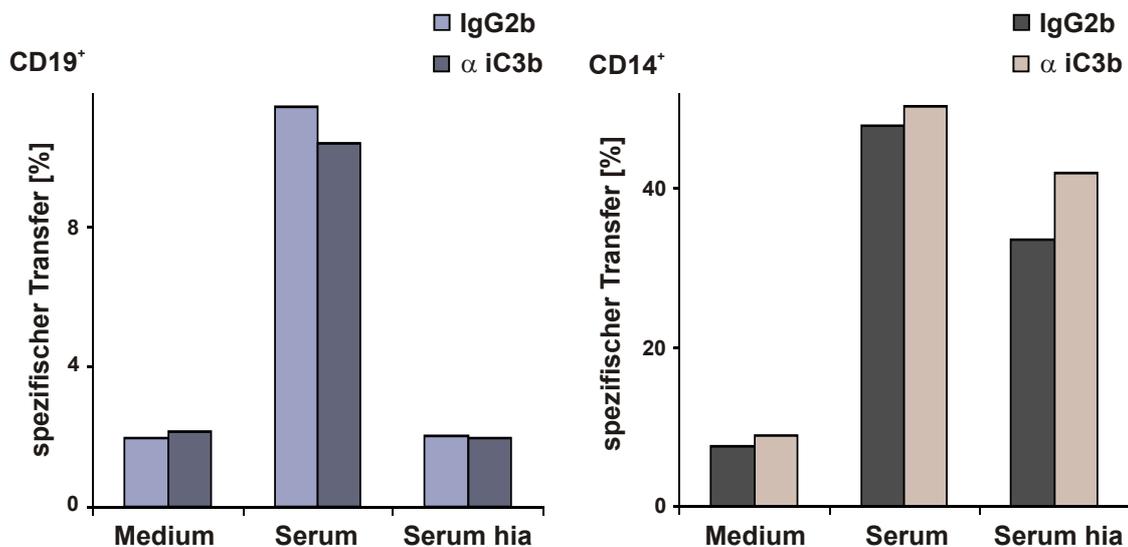


Abbildung 5.39: Spezifischer Transfer von Mikropartikeln mit α iC3b. Mikropartikel wurden mit Medium, Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum vorinkubiert. PBMCs und Dil markierte Mikropartikel wurden vor der Koinkubation mit 10 μ g/ml iC3b-Antikörper und IgG2b als Kontrolle inkubiert.

Der Transfer von Mikropartikeln kann, wie in Abbildung 5.39 dargestellt, durch den α iC3b-Antikörper nicht vermindert werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der Antikörper möglicherweise nicht die Interaktion von iC3b mit seinem Rezeptor blockiert.

5.4.8 Transfer mit Komplement-Rezeptor-Antikörpern

Es gibt verschiedene Rezeptoren, die für unterschiedliche Komplementkomponenten spezifisch sind. Der Komplementrezeptor CR2 (CD21) wird hauptsächlich auf B-Zellen gefunden, wo er auch zum Corezeptorkomplex der B-Zelle gehört und iC3b und C3dg erkennt. Der CR2-Rezeptor wird auch auf einigen T-Zellen und Epithelialzellen exprimiert.

Im Folgenden wurde analysiert, ob CR2 auf B-Zellen zum Mikropartikel-Transfer beiträgt. Um die Expression von CR2 auf den Akzeptorzellen zu untersuchen wurde eine Bindungsanalyse mit einem α CD21-Antikörper und der entsprechenden Isotypkontrolle durchgeführt.

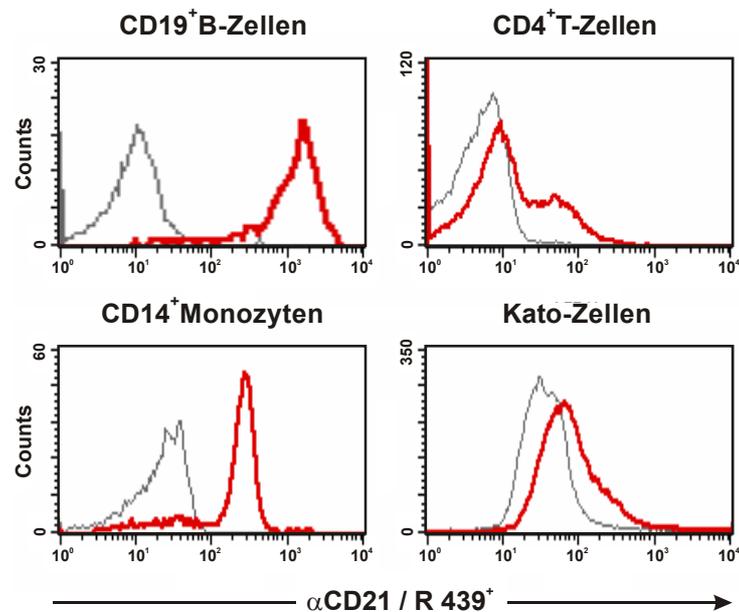


Abbildung 5.40: FACS-Analyse des α CD21-Antikörpers (Klon FE8) auf CD19⁺ B-Zellen, CD4⁺ Lymphozyten, CD14⁺ Monozyten und Kato-Zellen (rote Linie). Als Negativkontrolle wurde 10 μ g/ml IgG1 eingesetzt (graue Linie). Sowohl auf CD19⁺ B-Zellen, als auch auf CD14⁺ Monozyten, jedoch nur auf einer Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen ist eine Antikörper-Bindung zu erkennen.

Bei den Lymphozyten war die CR2 Expression im Vergleich zur Isotypkontrolle deutlich auf den CD19⁺ B-Zellen zu erkennen. Die T-Zellen präsentierten nur auf einer Subpopulation der CD4⁺ Lymphozyten eine Bindung, hingegen zeigte sich auf allen CD14⁺ Monozyten eine Bindung des Antikörpers (Abbildung 5.40).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob durch die Bindung des α CD21-Antikörpers an B-Zellen der Transfer mit Serum-inkubierten Mikropartikeln beeinflusst werden kann. Für die Transfer-Analysen wurden die Donorzellen (Kato-Zellen) zunächst in Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum inkubiert; die PBMCs als Akzeptorzellen wurden mit 10 μ g/ml α CD21 (Klon FE8), der bezüglich der Interaktion mit Komplementkomponenten als inhibitorisch beschrieben ist (Prodinger et al., 1998), und IgG1 als Kontrolle inkubiert.

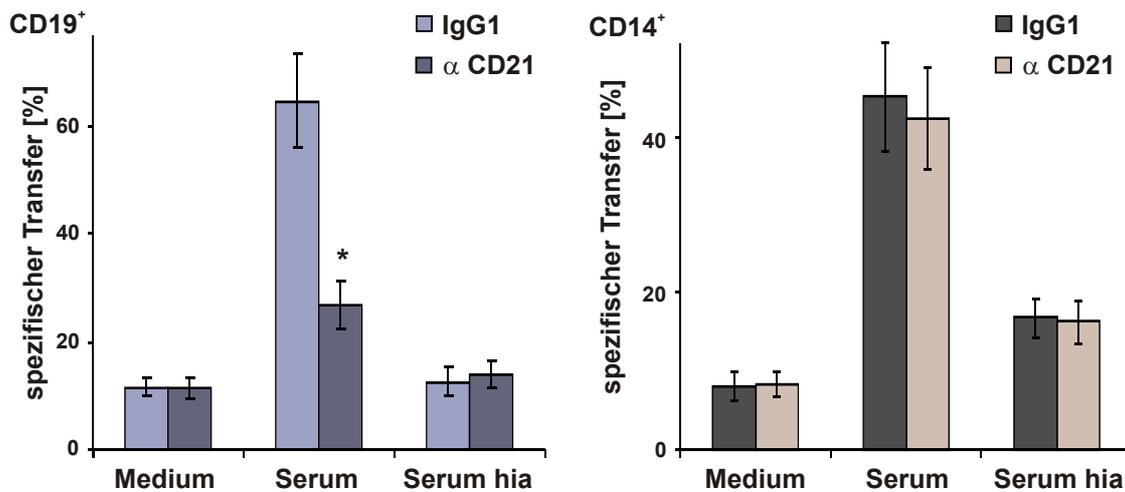


Abbildung 5.41: FACS-Analyse des Mikropartikel-Transfers mit CD21-Antikörper. Die markierten Kato-Zellen wurden mit Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum vorinkubiert, PBMCs mit 10 µg/ml α CD21 (Klon FE8) bzw. 10 µg/ml IgG1. Der Transfer auf CD14⁺ Monozyten (rechts) wurde durch α CD21 nicht beeinflusst, die B-Zellen (links) zeigten einen durch α CD21 reduzierten Serum-Transfer. Abgebildet sind die Mittelwerte ± SEM des spezifischen Transfers (*p<0.01 gegen die IgG1-Kontrolle, n=3).

Wie die FACS-Analyse in Abbildung 5.41 zeigt, konnte der spezifische Transfer von Mikropartikeln in Serum durch Blockade des Komplementrezeptor CR2 mit α CD21 auf CD19⁺ Lymphozyten um 57 % reduziert werden. Der Antikörper α CD21 hatte keinen Einfluss auf die Mikropartikel-Aufnahme durch CD14⁺ Monozyten.

Neben dem CR2-Rezeptor gibt es drei weitere Komplementrezeptoren. CR1 (CD35) wird auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten exprimiert, und bindet spezifisch an die Komplementkomponenten C3b und C4b. Die beiden Komplementrezeptoren CR3 und CR4 binden, analog zu CR2, an inaktive Formen von C3b. Sie sind Mitglieder der CD11/CD18-Leukozytenintegrinfamilie und werden auf Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten gefunden.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob diese anderen Komplementrezeptoren ebenfalls den Serum-Transfer beeinflussen können. Hierzu wurden Antikörper gegen die Komplementrezeptoren eingesetzt, um auf Akzeptorzellen eventuelle Bindungsstellen für die Komplementkomponenten, die den Mikropartikel-Transfer vermitteln, zu blockieren. Die Dil markierten Donorzellen waren in Medium, Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum vorinkubiert; die Akzeptorzellen (PBMCs) wurden mit je 10 µg/ml α CD35 (Klon J3D3), α CD21 (Klon FE8), α CD11b (Klon 94), α CD11c (Klon BU15) und IgG1

als Isotypkontrolle inkubiert. Nach der Koinkubation wurden die CD19⁺ B-Zellen und CD14⁺ Monozyten im FACS analysiert.

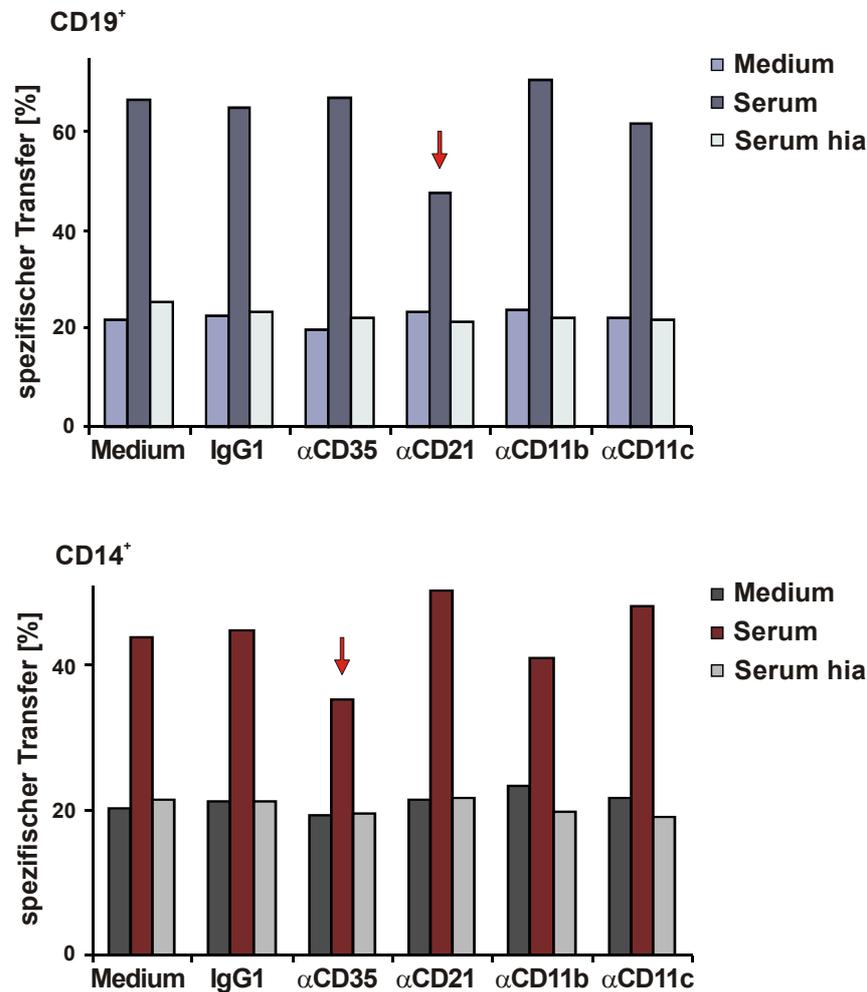


Abbildung 5.42: Spezifischer Mikropartikel-Transfer mit verschiedenen Antikörpern gegen Komplementrezeptoren. PBMCs wurden mit jeweils 10 µg/ml α CD35 (J3D3), α CD21 (FE8), α CD11b (94), α CD11c (BU15) bzw. IgG1 inkubiert. Kato-Zellen wurden in Serum bzw. Hitze-inaktiviertem Serum (hia) vorinkubiert. CD19⁺ B-Zellen (oben) nehmen nach Inkubation mit α CD21 (Pfeil) weniger mit Serum inkubierte Mikropartikel auf, CD14⁺ Monozyten (unten) zeigen einen durch α CD35 (Pfeil) verminderten Serum-Transfer.

Der spezifische Mikropartikel-Transfer auf CD19⁺ B-Zellen wurde, wie in Abbildung 5.42 gezeigt, nur durch α CD21-Antikörper reduziert, auf CD14⁺ Monozyten jedoch ist eine Beeinflussung durch den α CD35-Antikörper zu erkennen; der Transfer wurde hier um 22 % vermindert.

5.5 Funktionelle Assays

5.5.1 Einfluss des Transfers auf die Cytokinproduktion

Von besonderem Interesse ist die Charakterisierung der Produktion von immunregulatorischen Cytokinen. Es wurde der Einfluss der Aufnahme von Mikropartikeln auf die Cytokine untersucht, die von Monozyten gebildet werden und im Verlauf einer Immunantwort aktivierende oder inhibitorische Funktionen besitzen. Bestimmt wurde die IL-10-, GM-CSF- und TNF- α -Produktion.

Monozyten wurden mit magnetischen α CD14-Micro Beads angereichert und mit isolierten Mikropartikeln, die mit Serum bzw. Medium inkubiert waren, für den Transfer koinkubiert. Die nicht transferierten Mikropartikel wurden nach 90 Minuten ausgewaschen und die Monozyten mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach 48 h wurden die Überstände aus den Ansätzen abgenommen und die Freisetzung von Cytokinen in den Überständen mittels ELISA gemessen.

Die Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine GM-CSF und TNF- α wurde durch die Aufnahme von Mikropartikeln und besonders von Serum-beladenen Mikropartikeln signifikant reduziert. Die Monozyten zeigten nach einem Transfer eine erhöhte Freisetzung von IL-10, die nach dem Transfer von Serum-inkubierten Mikropartikeln intensiver war.

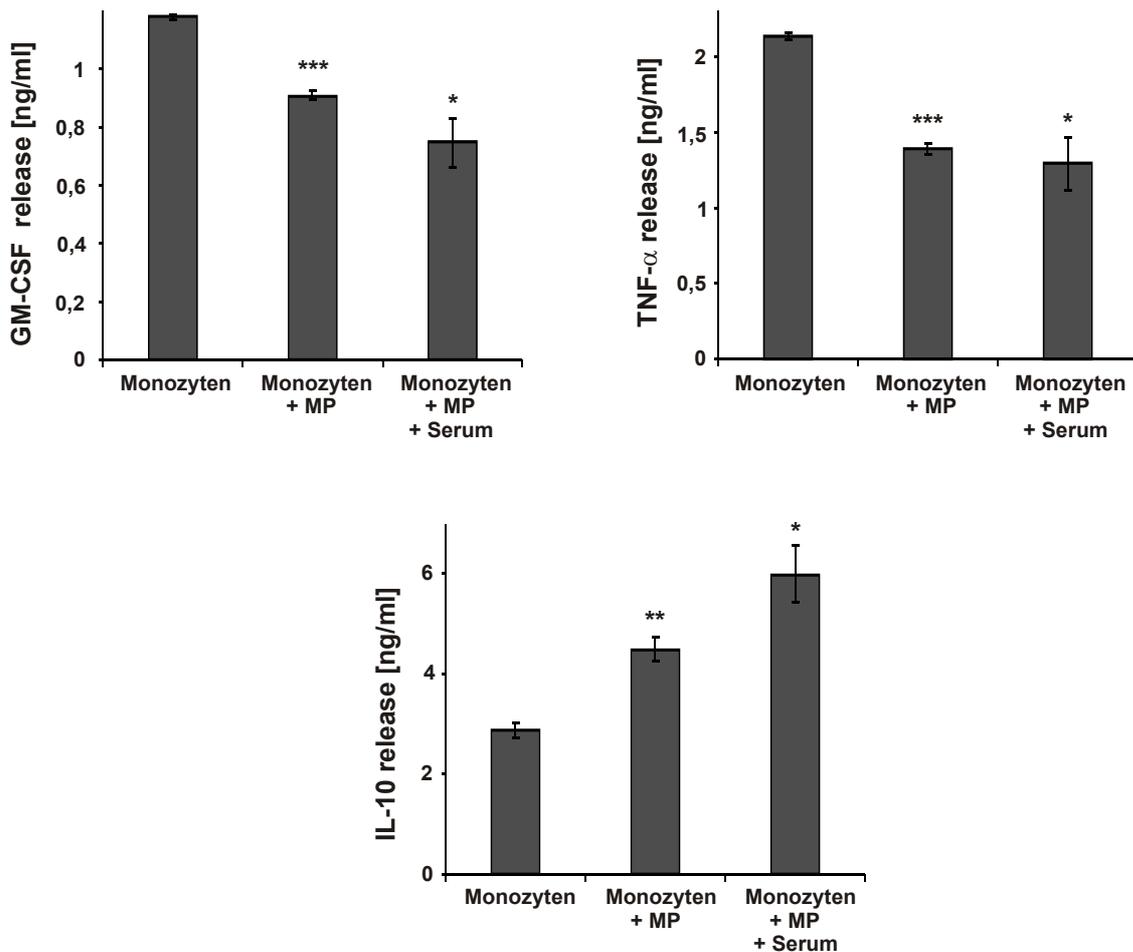


Abbildung 5.43: Cytokinfreisetzung (GM-CSF, TNF- α und IL-10) im Rahmen der Aufnahme von Mikropartikeln (MP). 100.000 CD14⁺ Monozyten wurden in Medium, mit Mikropartikeln bzw. mit Serum-inkubierten Mikropartikeln koinkubiert und mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Cytokingehalt im Überstand im ELISA gemessen (** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ vs. Mediumkontrolle, $n=3$).

5.5.2 Einfluss des Transfers auf die B-Zell-Aktivierung

Nachdem sich der Transfer auf B-Zellen besonders durch die Bindung der Komplementkomponente iC3b an Mikropartikel verstärkte, wurde im folgenden Ansatz die Auswirkung dieses erhöhten Transfers auf die B-Zell-Aktivierung genauer untersucht. Hierzu wurden auf den B-Zellen die Expression regulatorischer Aktivierungsmarker und kostimulatorischer Moleküle, wie CD25, CD86 und dem MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR und deren Größe nach dem Transfer analysiert.

Nachdem isolierte B-Zellen 90 min mit Serum-opsonierten Mikropartikeln bzw. ohne Mikropartikel inkubiert waren und die nicht transferierten Mikropartikel durch Waschen wieder entfernt waren, wurden die Zellen 48 h mit Medium bzw. PMA (10 ng/ml) kultiviert. Für die Analyse der Expression der Aktivierungsmarker per FACS wurden die B-Zellen mit α CD19-FITC, sowie mit Antikörper gegen CD25, HLA-DR und CD86 markiert. Änderung der B-Zell Größe (FSC) konnten im *forward light scatter* untersucht werden.

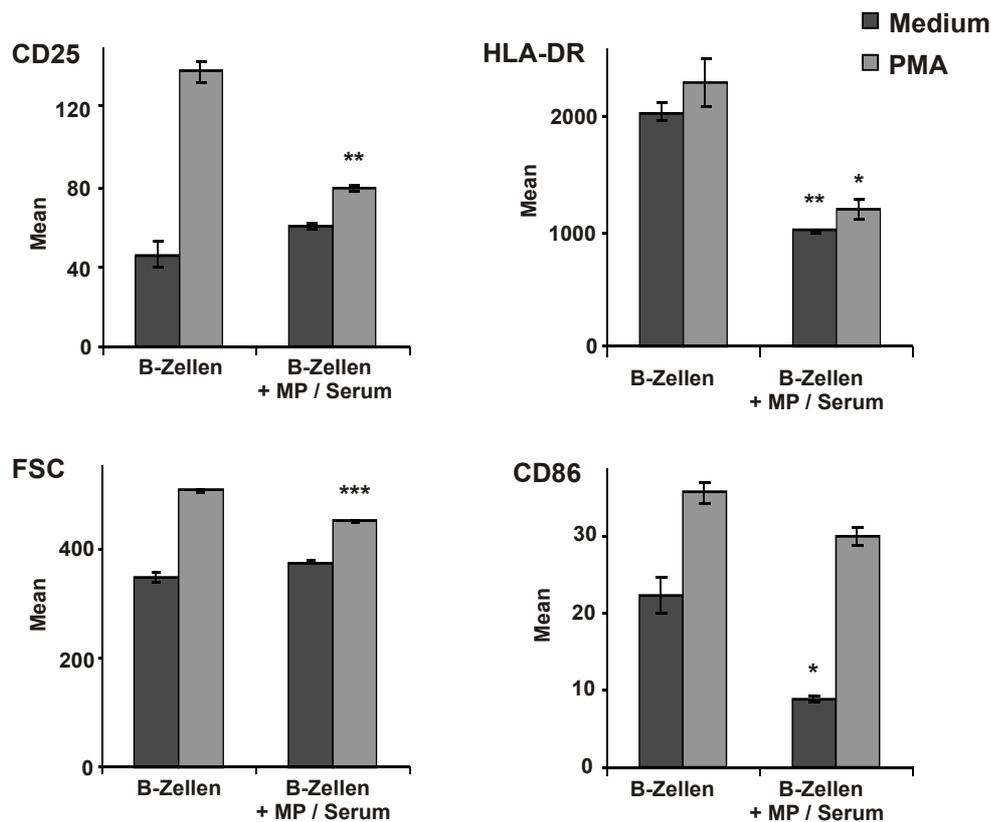


Abbildung 5.44: Expression von Oberflächenmarkern auf B-Zellen nach Aufnahme von Mikropartikeln (MP). 50.000 isolierte CD19⁺ B-Zellen wurden mit bzw. ohne Serum-beladenen Mikropartikeln inkubiert und in Medium bzw. in Medium mit 10 ng/ml PMA stimuliert. Nach 48 h wurden im FACS die B-Zellen auf Expression von CD25, MHC-Klasse II (HLA-DR), CD86 und auf ihre Größe (FSC) untersucht (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ vs. unbehandelte B-Zellen; $n=3$).

Nachdem die B-Zellen iC3b beladene Mikropartikel aufgenommen hatten, zeigten die Analysen unter basalen Bedingungen, d.h. ohne Stimulation durch PMA, eine deutlich verringerte Expression von MHC-Klasse II und CD86, während die Größe und CD25-Expression unverändert blieben (Abbildung 5.44). Durch Stimulation mit PMA exprimierten die B-Zellen ohne Aufnahme von Mikropartikeln wesentlich mehr CD25 und CD86 und eine Zunahme der Größe

wurde ersichtlich. Dieser PMA-induzierte Anstieg der Zellgröße und der CD25-Expression, jedoch nicht der CD86-Expression, konnte durch einen Transfer mit serum-inkubierten Mikropartikeln signifikant reduziert werden.

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mikropartikel, die unter physiologischen Bedingungen gebildet werden, zu charakterisieren, den Mechanismus ihres Transfers auf Akzeptorzellen zu analysieren und den Einfluss von transferierten Vesikeln auf Akzeptorzellfunktionen zu untersuchen. Mikropartikel wurden hierfür aus Kato-Zellen (humane Magenkarzinomzellen) oder aus CHO-Zellen gewonnen. Als Akzeptorzellen dienten Monozyten und Lymphozyten aus isolierten PBMCs.

6.1 Charakterisierung der Mikropartikel

Es werden verschiedene Mikropartikel-Typen beschrieben, die einer interzellulären Kommunikation dienen. Die am häufigsten charakterisierten Mikropartikel entstammen Thrombozyten (George et al., 1982). Jedoch können auch Membranvesikel, die von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen abgesondert werden, *in vivo* auftreten. Besonders auffällig ist eine Zunahme von Membranvesikeln im peripheren Blut bei bestimmten Erkrankungen. Ferner existieren Exosomen, die von verschiedenen Zelltypen durch Exozytose freigesetzt werden und die ebenfalls zwischen verschiedenen Zellen übertragen werden. Außerdem entstehen bei der Apoptose Membranvesikel, die als apoptotische Vesikel bezeichnet werden.

Die Freisetzung von Membranvesikeln/Mikropartikeln scheint bei verschiedenen Zellen ein physiologischer Vorgang zu sein. In dieser Studie wurden Mikropartikel nach 90 min Inkubation der Donorzellen (Kato-Zellen, CHO-Zellen) ohne Stimulation in Medium durch Zentrifugation des zellfreien Überstandes bei 16.000 x g gewonnen. Mikropartikel-Membranen bestehen meistens aus einer Phospholipid-Doppelschicht und Membran-Proteinen. Die Zusammensetzung ist abhängig vom zellulären Ursprung und dem Prozess des Abschnürens. Die Phospholipid-Zusammensetzung variiert zwischen verschiedenen Zellen und ihre asymmetrische Verteilung ist im Vergleich zur Ursprungszelle zerstört (Zwaal and Schroit, 1997). Membranvesikel, die unter physiologischen Bedingungen gebildet werden oder durch Zellaktivierung entstehen, unterscheiden sich von den apoptotischen Vesikeln und Exosomen nicht nur in ihrer Lipid- und Protein-Zusammensetzung, sondern auch in ihrer Größe und in ihren (patho-) physiologischen Effekten.

Die in dieser Arbeit isolierten Membranvesikel zeigten eine eindeutige Färbung mit dem Calcium-abhängigen Liganden für Phosphatidylserin, AnnexinV-FITC,

was auf eine Externalisierung von Phosphatidylserin schließen lässt. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Membranvesikeln um Exosomen handelt, da diese aus intrazellulären Kompartimenten abstammenden Vesikel keine Phosphatidylserin-Externalisierung aufweisen (Stoorvogel et al., 2002; Thery et al., 2002). Die Präsentation von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran ist ein Charakteristikum, das diese Membranvesikel mit apoptotischen Zellen gemeinsam haben. Auch in Bezug auf die Größe, können Membranvesikel von Exosomen unterschieden werden. Die hier verwendeten Mikropartikel, weisen einen Durchmesser von 0,1 - 1 µm auf (Mack et al., 2000 ; Combes et al., 1999). Die exosomalen Vesikel sind mit einer Größe von 40 - 90 nm deutlich kleiner. Apoptotische Vesikel sind auch in der Größe von 0,5 – 1,2 µm den Membranvesikel sehr ähnlich (Kolowos et al., 2005).

Die Bildung apoptotischer *membrane blebs* ist abhängig von der Caspase-induzierten Aktivität der Rho-assoziierten Kinase ROCK-I, welche an der Phosphorylierung von Myosin und der Bindung von Aktin-Myosin-Filamenten an die Plasmamembran beteiligt ist (Coleman et al., 2001). Die katalytische Aktivität von ROCK-I, welche durch das Pyridin-Derivat Y-27632 inhibiert werden kann, zeigte in der Ausbildung und Freisetzung von Mikropartikeln unter physiologischen Bedingungen keinen Effekt, was für unterschiedliche Mechanismen bei der Entstehung von Mikropartikeln und apoptotischen Vesikeln spricht.

6.2 Charakterisierung des Transfers von Mikropartikeln

Ein entscheidendes Kriterium für eine interzelluläre Kommunikation ist der Austausch von Informationen über bioaktive Moleküle. Der Transfer von Membranvesikeln, bei dem z. B. Membranproteine und zytoplasmatische Komponenten übertragen werden, ist dabei als eine Möglichkeit der interzellulären Kommunikation anzusehen. Membranvesikel können von Leukozyten freigesetzt, und auch wieder von ihnen aufgenommen werden. Durch die Freisetzung in den Blutkreislauf steht den Membranvesikeln ein umfangreicher Wirkungsbereich zur Verfügung und sie kommen gleichzeitig mit Plasmabestandteilen in Berührung (Freyssinet, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kato-Zellen Membranvesikel abschnüren und diese von PBMCs aufgenommen werden. Dabei wurde deutlich, dass auch Membranproteine, wie z. B. das transmembrane Glykoprotein EpCAM, welches stark auf Kato-Zellen, aber ursprünglich nicht auf PBMCs exprimiert wird, nach dem Transfer auf PBMCs zu finden ist.

Die Freisetzung von Mikropartikeln wurde als erstes bei Thrombozyten beschrieben (George et al., 1982), welche Thrombozyten-spezifische

Rezeptoren auf andere Zellen, z. B. Endothelzellen, transferieren können (Janowska-Wieczorek et al., 2001). Dadurch werden Endothelzellen aktiviert, die Expression von Adhäsionsmolekülen intensiviert und die Bindung von Monozyten an Endothelzellen verstärkt (Barry et al., 1998). Der Transfer von Membranproteinen durch Mikropartikel kann auch Chemokinrezeptoren betreffen. So werden von Thrombozyten und Megakaryozyten CXCR4 positive Membranvesikel abgeschnürt (Majka et al., 2001), oder von verschiedenen Zellen CCR5 positive Mikropartikel abgeschnürt, die auf CCR5 negative Zellen übertragen werden können (Mack et al., 2000). Die Produktion dieser Mikropartikel scheint ein regulierter und gerichteter Prozess zu sein, da nicht immer die Proteine, die am häufigsten auf der Ursprungszelle exprimiert sind, auch auf die Membranpartikel übertragen werden (Abid Hussein et al., 2003; Blanchard et al., 2002).

Die Vielfalt der Bildung und auch der Aufnahme von Mikropartikeln wurde bei verschiedenen Zell-Typen veranschaulicht. Sowohl mittels durchflußzytometrischen Analysen, als auch in der Fluoreszenzmikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit der Mikropartikel-Transfer von Kato-Zellen auf PBMCs dargestellt und gemessen werden, desgleichen konnte auch ein Transfer von Mikropartikeln, die von PBMCs gebildet wurden, auf Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen beobachtet werden. Bei Transfer-Analysen mit unterschiedlichen Temperaturen wurde deutlich, dass es sich hierbei um einen Prozess handelt, der nur bei 37°C stattfindet. Insofern konnte gezeigt werden, dass es sich beim Transfer von Mikropartikeln um einen aktiven Prozess handelt. Zellfunktionen, wie z. B. die Aktivität von Enzymen, sind in der Regel bei physiologischen Temperaturen wirksam. Möglicherweise ist hinsichtlich der Temperatur von 37°C auch die Membranfluidität ein entscheidendes Kriterium, damit die dynamische Struktur der Zellen erhalten bleibt und infolgedessen die Aufnahme von Mikropartikeln in die Zellmembranen gewährleistet ist. Bei Temperaturen von 4°C befinden sich die Zellen und besonders die Zellmembran in einem inaktiven Zustand, bei dem sich die Lipid-Doppelschicht in einer streng parallelen, rigiden Anordnung befindet. Eine Mikropartikel-Aufnahme in oder durch die Membran in die Zelle wird daher bei niedrigen Temperaturen erschwert. Ebenso ist bei höheren Temperaturen eine stärkere laterale Mobilität von Enzymen und Proteinen innerhalb der Membran präsent, wodurch der Transfer von Mikropartikeln beeinflusst und vermittelt werden könnte. Da die PBMCs verschiedener Spender als Akzeptorzellen verwendet wurden, traten gewisse Schwankungen in der Effizienz des Mikropartikel-Transfers auf. Dies könnte auf unterschiedliche Aktivierungszustände der Blutzellen zurückzuführen sein. Trotzdem konnte in einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, dass unterschiedliche Zellpopulationen (z. B. Monozyten oder Lymphozyten) verschiedene Mechanismen verwenden, um Mikropartikel aufzunehmen.

6.3 Calcium und Annexin V vermitteln den Vesikel-Transfer

Schon der Mikropartikel-Transfer in Medium offenbarte eine Abweichung in der Vesikel-Aufnahme zwischen Monozyten und Lymphozyten. Bei Analysen, die Aufschluss über die Calcium-Abhängigkeit des Transfers geben sollten, zeigte sich, dass extrazelluläres Calcium, welches dem Medium zugesetzt wurde, den Transfer auf Monozyten und Lymphozyten erhöhte. Wurde indessen das Calcium durch EDTA entfernt war der Transfer auf Monozyten deutlich gehemmt, jedoch der Transfer auf Lymphozyten im Vergleich zur Mediumkontrolle gleich bleibend. Die Reduktion des Transfers auf Monozyten war allerdings nur dann zu beobachten, wenn das EDTA während der Inkubation von Donorzellen und Akzeptorzellen vorhanden blieb. Calcium reguliert eine große Vielfalt elementarer zellulärer Prozesse, wie z. B. die Zytoskelett-Struktur, die Bewegungsfähigkeit einer Zelle, die Phosphorylierung von Proteinen, Zell-Zell-Interaktionen und -Fusionen (Davis, 1992) und hat eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung von Mikropartikeln und der Externalisierung von Phosphatidylserin (Bucki et al., 1998; Hampton et al., 1996; Comfurius et al., 1990). Da aber eine EDTA-Inkubation ausschließlich der Donorzellen, die Phosphatidylserin-präsentierende Mikropartikel bilden, nicht zur Hemmung des Mikropartikel-Transfers führte, sondern auch den Akzeptorzellen während des Transfers extrazelluläres Calcium entzogen werden musste, scheint neben einer eventuellen durch EDTA verursachten Hemmung der Phosphatidylserin-Externalisierung auf Mikropartikeln, auch die Aufnahme der Mikropartikel durch Monozyten Calcium-abhängig zu sein. Auch intrazellulärem Calcium kommt für den Transfer eine Bedeutung zu, was sich wiederum besonders bei Monozyten zeigte. Durch Blockieren des Ca^{2+} -Einstroms und der Ca^{2+} -ATPase durch LaCl_3 bzw. ZnCl_2 wurde in erster Linie die Mikropartikel-Aufnahme durch Monozyten beeinträchtigt.

Calcium ist auch für die Assoziation von Annexin V an die Plasmamembran essentiell. Obgleich die physiologische Relevanz von Annexin V *in vivo* noch unklar ist, so wird Annexin V dennoch eine Beteiligung bei der Calcium-aktivierten Exocytose von Neurotransmittern, Vesikel-Ausbildung, -Anlagerung und -Fusion mit der Plasmamembran zugesprochen (Creutz, 1992; Gruenberg and Emans, 1993; Swairjo and Seaton, 1994). Annexin V ist hauptsächlich intrazellulär lokalisiert, wird aber auch zum Teil aus der Zelle freigesetzt und bindet dann an die äußere Zellmembran (Pfaffle et al., 1988). Im Plasma gesunder Individuen wurde Annexin V mit einer Konzentration von 1,7 ng/ml ermittelt (Kaneko et al., 1996). Aus Bindungsstudien mit einem Annexin V-Antikörper ging hervor, dass Annexin V-Moleküle auf einem Teil der Monozyten und Kato-Zellen (Donorzellen) vorhanden sind. Wie in Experimenten mit Annexin V-FITC und -Biotin gezeigt wurde, hemmen diese Moleküle den Transfer, wenn sowohl die Donor- als auch die Akzeptorzellen damit inkubiert

waren. Hingegen hatte unmarkiertes rekombinantes Annexin V keinen Einfluss auf den Mikropartikel-Transfer auf Monozyten. Diese Resultate lassen vermuten, dass auf Donor- und Akzeptorzellen physiologisch gebundene Annexin V-Moleküle den Transfer und die Mikropartikel-Fusion unterstützen. Nach Zugabe von markiertem Annexin V wird möglicherweise physiologisch gebundenes Annexin V verdrängt und die Fluorochrome beeinträchtigen eventuell die für Fusionsprozesse relevanten Bindungsstellen. Zudem konnte nach Inkubation der Donor- und Akzeptorzellen mit Annexin V-Antikörper ebenfalls ein reduzierter Transfer beobachtet werden, was auf einen blockierenden Effekt dieses Antikörpers auf physiologisch gebundene Annexin V-Moleküle hinweist. Auch die Beobachtung, dass durch Entfernen von Calcium der Transfer herabgesetzt war, könnte auf eine Transfer- und Fusions-Funktion des Annexin V, das Ca^{2+} -abhängig an Plasmamembranen bindet, hinweisen.

Capila et al. zeigten auch eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von Annexin V an die Glykosaminyglykane Heparin und Heparansulfat, jedoch nicht an Chondroitinsulfat (Capila et al., 2001; Ishitsuka et al., 1998). In Experimenten, bei denen die Zellen für einen Transfer mit Heparin oder Chondroitinsulfat A behandelt wurden, konnte eine Hemmung der Mikropartikel-Aufnahme nur durch Heparin, nicht aber durch Chondroitinsulfat A auf Monozyten ersichtlich werden. Möglicherweise ist bei diesem Ansatz die Funktionsweise von Annexin V durch die Bindung von Heparin blockiert. Allerdings muss man berücksichtigen, dass Heparin mit vielen Proteinen interagiert und keine spezifische Hemmung von Annexin V postuliert werden kann. Chondroitinsulfat A, das nicht an Annexin V bindet und somit den Annexin V-vermittelten Transfer nicht beeinträchtigen kann, hatte auch keinen Einfluss auf den Mikropartikel-Transfer.

Die bisher besprochenen Ergebnisse stellen nur den Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten dar. Auffallend sind jedoch die Resultate, die beim Transfer auf Lymphozyten zu verzeichnen waren und sich vorwiegend konträr zum Monozyten-Transfer darstellen. Durch zusätzliches Calcium konnte auch bei den Lymphozyten ein erhöhter Transfer verzeichnet werden, allerdings wurde durch Hemmung des extrazellulären und des intrazellulären Calciums keine Reduktion der Mikropartikel-Aufnahme beobachtet. Annexin V-Moleküle konnten mit Hilfe des Annexin V-Antikörpers nicht auf Lymphozyten detektiert werden und Transfer-Experimente mit dem blockierenden Annexin V-Antikörper ergaben nur eine geringe Minderung beim Transfer auf Lymphozyten. Dazu passend zeigte sich durch markiertes Annexin V kein Einfluss auf den Mikropartikel-Transfer auf CD4^+ T-Zellen. Die Effekte, die das Glykosaminyglykan Heparin auf den Mikropartikel-Transfer bei den Monozyten hatte (Abschwächung), waren beim Transfer auf Lymphozyten genau entgegengesetzt (Verstärkung). Insgesamt ist deutlich zu erkennen, dass es sich beim Transfer auf Monozyten und Lymphozyten um zwei unterschiedliche Mechanismen handeln muss.

6.3.1 Bedeutung der Thiol-Gruppen und des Zytoskeletts beim Transfer

Fusionsprozesse können durch Inaktivierung zahlreicher Proteine und Enzyme infolge einer Hemmung der Thiol-Gruppen inhibiert werden. Die Sulfhydryl-Reagenzien N-ethylmaleimid (NEM) und Quecksilberchlorid (HgCl_2) sind in der Lage Cysteinreste chemisch zu modifizieren und folglich eine Vesikel-Vesikel oder Vesikel-Plasmamembran-Fusion zu verhindern (Vogel and Zimmerberg, 1992). Dabei werden unter anderem auch Annexine durch NEM modifiziert. Annexine, die an Phosphatidylserin gebunden sind, können durch Protein-Protein-Interaktionen ein zweidimensionales Netzwerk auf Membranoberflächen ausbilden (Oling et al., 2000; Gidon-Jeangirard et al., 1999) und eine Liposomenaggregation verursachen. Sulfhydryl-Gruppen dieser Annexine können durch NEM so modifiziert werden, dass die Netzwerkbildung gehemmt ist (Singh and Liu, 2000). In der vorliegenden Studie wurde durch NEM eine 96 %ige Hemmung des Mikropartikel-Transfers auf Monozyten nach Behandlung der Monozyten gezeigt. Dieser durch NEM herbeigeführte Effekt kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits kann das auf den Monozyten gebundene Annexin V durch NEM an der Ausbildung von Tetrameren gehemmt sein und so die Mikropartikel-Aufnahme beeinträchtigen. Andererseits wird durch das unspezifische Thiol-Reagenz NEM auch die Struktur einer Vielzahl von Proteinen (evtl. Fusionsproteine) und Enzymen, die eine putative Rolle beim Mikropartikel-Transfer spielen können, verändert. Auffällig war bei diesem Experiment die starke Zunahme des Transfers bei Lymphozyten, wenn die Mikropartikel-bildenden Donorzellen mit NEM behandelt waren. Kenis et al. vertreten die Hypothese, dass das zweidimensionale Annexin V-Netzwerk, welches sich auch auf der Phosphatidylserin-externalisierenden Oberfläche apoptotischer Zellen organisiert (Gidon-Jeangirard et al., 1999), die Bildung und Freisetzung apoptotischer Vesikel inhibiert. Dieser Prozess wird auch auf lebenden Zellen beschrieben (Kenis et al., 2004). Das durch NEM zerstörte Annexin V-Netzwerk ermöglicht eventuell eine vermehrte Bildung von Mikropartikeln, die zu einem erhöhten Mikropartikel-Transfer (auf Lymphozyten) führen können. Ein dem NEM ähnlicher Effekt konnte auch mit Quecksilberchlorid (HgCl_2), einem spezifischen Thio-Reagenz, beobachtet werden. Auch hier reichte die Behandlung der Akzeptorzellen (Monozyten) aus um eine deutliche Inhibition des Mikropartikel-Transfers zu erreichen. Daraus lässt sich schließen, dass der Effekt von NEM und HgCl_2 über eine Hemmung der Thiol-Gruppen zustande kommt.

Die Funktion des Zytoskeletts beim Transfer wurde außerdem durch Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D, das durch Bindung an F-Aktin die Aktin-Filament-Struktur zerstört (Heidemann et al., 1999), untersucht. Das Zytoskelett ist für Bewegungen der gesamten Zelle ebenso verantwortlich, wie

es intrazelluläre Transportprozesse steuert. Der reduzierte Mikropartikel-Transfer auf Monozyten nach Inkubation der Monozyten mit Cytochalasin D gibt Hinweis auf einen aktiven Prozess der Mikropartikel-Aufnahme, der bei B-Zellen und anderen Lymphozyten nicht beobachtet werden konnte, und die Unterstützung des Zytoskeletts erfordert.

6.3.2 Transfer von Mikropartikeln wird nicht durch Phagozytose vermittelt

Beim Transfer von Mikropartikeln in Medium wird deutlich, dass Monozyten im Vergleich zu Lymphozyten wesentlich effizienter Mikropartikel aufnehmen. Die Tatsache, dass Monozyten zu den professionellen Phagozyten zählen, lässt vermuten, dass die Aufnahme der Mikropartikel durch Phagozytose entrichtet wird. Zudem ähneln die Mikropartikel, durch die Externalisierung von Phosphatidylserin, apoptotischen Vesikeln, die durch Phagozyten identifiziert und phagozytiert werden (Fadok et al., 1998a). Dazu stehen auf Phagozyten-Membranen verschiedene Rezeptoren und Moleküle, wie z. B. der LPS-Rezeptor CD14, Integrine, Scavenger-Rezeptoren (CD36) und Phosphatidylserin-Rezeptoren zur Verfügung (Fadok and Chimini, 2001). Besonders der monoklonale Antikörper mAb 217 gegen Phosphatidylserin inhibiert die Phagozytose von apoptotischen Zellen (Fadok et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Phagozytose-blockierende Antikörper auf Akzeptorzellen angewendet, um den Transfer auf Monozyten zu verhindern. Da jedoch keiner der eingesetzten Antikörper den Transfer, weder auf Monozyten, noch auf Lymphozyten, zu beeinträchtigen vermochte, erscheinen Phagozytosemechanismen, wie sie für apoptotische Zellen beschrieben sind, als unwahrscheinlich.

6.3.3 Bedeutung der SNARE-Proteine beim Mikropartikel-Transfer

An Fusionsprozessen unterschiedlicher Systeme sind vielfach Moleküle des SNARE-Komplexes beteiligt (Pelham, 2001; Chen and Scheller, 2001). VAMP I (Synaptobrevin), welches zu den Vesikel-assoziierten SNARE-Proteinen zählt und Vesikel-Fusionen herbeiführt (Hunt et al., 1994), konnte auf Monozyten identifiziert werden, hingegen zeigte das Protein auf Lymphozyten und Donorzellen keine Expression (Daten nicht gezeigt). Transfer-Experimente mit einem Antikörper gegen VAMP I ergaben allerdings keine Blockade des Mikropartikel-Transfers auf Monozyten oder Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Desgleichen konnte kein gehemmter Mikropartikel-Transfer auf Monozyten durch Inkubation der Akzeptor- und Donorzellen mit Tetanus-Toxin, das VAMP-Moleküle von der Vesikelmembran löst (Schiavo et al., 1994) erzielt

werden. Auch durch Inkubation der Akzeptor- und Donorzellen mit Botulinum-Toxin A, welches das auf der Plasmamembran verankerte SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein*) spaltet, konnten keine bedeutenden Veränderungen bei der Mikropartikel-Aufnahme dargestellt werden.

Epimorphin (Syntaxin 2A), ein ebenfalls an Membranfusionen beteiligtes t-SNARE-Protein, besitzt die Besonderheit, durch eine Umgestaltung der Sequenz, sich an Membranen extrazellulär zu orientieren (Hirai, 2001). Durch einen blockierenden Antikörper gegen Epimorphin konnte jedoch keine Hemmung des Mikropartikel-Transfers erzielt werden (Daten nicht gezeigt), woraus man schlussfolgern kann, dass dieses SNARE-Molekül nicht an der Membranfusion der hier untersuchten Mikropartikel mit PBMCs beteiligt ist.

Die Untersuchungen der SNARE-Proteine zeigten, dass weder SNAP-25, noch VAMP I, das auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert wird, den Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten oder Lymphozyten herbeiführen.

6.3.4 Bedeutung der Tetraspanine beim Mikropartikel-Transfer

Tetraspanine bilden eine weit verbreitete Protein-Gruppe, die neben vielen Funktionen auch Membran-Fusions-Prozesse unterstützen (Tachibana and Hemler, 1999; Boucheix and Rubinstein, 2001). Nachdem sich in Bindungsanalysen gezeigt hat, dass die untersuchten Tetraspanine (CD9, CD63, CD81 und CD82) auf den Akzeptor- und Donorzellen exprimiert sind, konnte jedoch in Transfer-Experimenten mit blockierenden Antikörpern gegen diese Proteine keine eindeutige Reduktion der Mikropartikel-Übertragung festgestellt werden. Insofern lässt sich aus diesen Versuchen eine Bedeutung der Tetraspanine beim Transfer von Mikropartikeln nicht bestätigen.

6.4 Transfer von Mikropartikeln auf Monozyten inhibiert pro-inflammatorische Cytokinproduktion

Die immunmodulierende Auswirkung des Transfers von Mikropartikeln auf Monozyten wurde in dieser Arbeit durch Bestimmung der Cytokinfreisetzung nach Aufnahme der Mikropartikel evaluiert. Dabei wurde beobachtet, dass die Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten die LPS stimulierte Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine GM-CSF und TNF- α inhibiert und die Ausschüttung des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 verstärkt. Die Induktion eines anti-inflammatorischen Phänotyps bei Makrophagen durch apoptotische Zellen ist bereits seit längerem bekannt (Fadok et al., 1998b). Durch die Phagozytose apoptotischer Lymphozyten wurde die Freisetzung von IL-10 durch Makrophagen erhöht, zudem die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine

vermindert (Voll et al., 1997). Ähnliche Effekte wurden nach dem Kontakt apoptotischer, neutrophiler Zellen mit humanen LPS-stimulierten Makrophagen beobachtet. Die Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β wurde verringert, die von IL-10 und TGF- β erhöht (Byrne and Reen, 2002; Fadok et al., 1998b). Die Externalisierung von Phosphatidylserin auf der apoptotischen Zelloberfläche scheint hierbei von Bedeutung zu sein (Huynh et al., 2002). Die Interaktion von Phosphatidylserin-präsentierenden Liposomen mit dem Phosphatidylserin-Rezeptor unterdrückt durch Ausschüttung des anti-inflammatorischen Cytokins TGF- β eine Entzündung in Geweben (Hoffmann et al., 2005). Mikropartikel, die von Neutrophilen abgesondert wurden, können die Cytokinproduktionen von Makrophagen beeinflussen, wobei erhöhte TGF- β - aber auch verringerte IL-10-Konzentrationen gemessen wurden (Gasser and Schifferli, 2004). In der vorliegenden Studie konnte ein Anstieg der IL-10-Produktion durch Monozyten nach Mikropartikel-Aufnahme verzeichnet werden, jedoch keine Änderungen der TGF- β -Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Diese Unterschiede könnten durch die Verwendung von Monozyten statt Makrophagen und Kato-Zell-produzierten Mikropartikeln anstelle von Neutrophilen erklärt werden. Die Externalisierung von Phosphatidylserin auf den Mikropartikeln scheint höchstwahrscheinlich für die reduzierte Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine durch Monozyten mitverantwortlich zu sein. Die Aufnahme von Mikropartikeln durch Monozyten unterbindet durch die Sezernierung anti-inflammatorischer Cytokine und durch die suppressiven Effekte von IL-10 eine Aktivierung pro-inflammatorischer Zellen, wie Granulozyten und Makrophagen. Hierdurch wird die physiologische Bedeutung von Mikropartikeln, die ständig und ohne Stimulation gebildet werden, und deren Transfer auf Monozyten deutlich. Die in dieser Arbeit beobachteten anti-inflammatorischen Immunmodulationen nach dem Transfer von Mikropartikeln könnte eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz spielen.

6.5 Komplementkomponenten vermitteln den Transfer von Mikropartikeln auf B-Zellen

Der Mikropartikel-Transfer in Medium war auf Lymphozyten im Vergleich zu Monozyten deutlich geringer. Unter physiologischen Bedingungen, d. h. in einem Milieu, das dem im Blutkreislauf gleichkommt, zeigte sich, dass die Aufnahme von Mikropartikeln durch eine Subpopulation der Lymphozyten in Vollblut drastisch zunahm. Färbung der Lymphozyten-Populationen mit spezifischen Markern identifizierten die CD19⁺ B-Zellen als die Zellfraktion, bei der ein Anstieg des Transfers in Serum stattfindet. Durch separate Inkubation der Donor- und Akzeptorzellen mit Serum offenbarte sich, dass der Anstieg des

Transfers auf CD19⁺ B-Zellen durch einen Serum-Faktor, der auf den Mikropartikel-bildenden Donorzellen und den Mikropartikeln selbst irreversibel bindet, verursacht wird. Die putative Serum-Komponente, die für den verstärkten B-Zell-Transfer verantwortlich war, wurde nach Hitze-Inaktivierung des Serums als Komplementkomponente identifiziert. Der spezifische Transfer auf B-Zellen mit Hitze-inaktiviertem Serum reduzierte den Serum-Transfer signifikant um 75 %. Dies konnte sowohl durchflußzytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden.

Für die Analyse der putativen Komplementkomponente, wurden vorerst die Komplementproteine in Betracht gezogen, die am Anfang der Enzymkaskade stehen. Die Aktivierung des klassischen Komplementweges erfolgt durch antigen-gebundene IgM- und IgG-Antikörper, die mit dem C1-Komplex, der aus einer C1q-Komponente und einem Tetramer aus je zwei C1r- und C1s-Komponenten besteht, interagieren (Sim and Reid, 1991). Aktiviertes C1r spaltet C4 und anschließend C2, worauf sich die C3-Konvertase des klassischen Weges bildet. Zahlreiche C3-Moleküle werden dadurch in C3b gespalten, die pathogene Oberflächen erkennen und Komplementrezeptor-vermittelt von Phagozyten beseitigt werden. Die Fähigkeit von C1q an apoptotische Zellen und Vesikel zu binden (Korb and Ahearn, 1997), ist auch bei dieser Fragestellung von Bedeutung, da die in dieser Studie verwendeten Mikropartikel durch die Phosphatidylserin-Externalisierung den apoptotischen Vesikeln ähnlich sind. Bei der Aktivierung des alternativen Komplementweges steht C3 an erster Stelle (Isenman et al., 1981). Durch mikrobielle Oberflächen wird C3b abgespalten und lagert sich an die Oberflächen an.

Die Verwendung von Seren, bei denen die Komplementkomponenten C1q, C2 oder C3 depletiert waren, zeigte, dass der Mikropartikel-Transfer auf B-Zellen in Gegenwart von C3-depletiertem Serum ähnlich reduziert war, wie bei Hitze-inaktiviertem Serum. Der Transfer nach Depletion von C1q und C2 war nur geringfügig beeinträchtigt. Nach Zugabe von C3 zu C3-depletiertem Serum stellte sich der verstärkte Transfer, vergleichbar mit dem Serum-Transfer, wieder ein. Allerdings hatte die Behandlung der Mikropartikel mit der Komplementkomponente C3 alleine keine Auswirkung auf die Aufnahme von Mikropartikeln durch B-Zellen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass weitere Serumkomponenten ebenfalls für die C3-Aktivierung und die Erhöhung des Transfers erforderlich sind.

Die wesentliche Rolle von C3 und die Fähigkeit der Serum-behandelten Mikropartikel Komplementwege zu aktivieren, wird zusätzlich durch die Beobachtung, dass sich iC3b auf der Oberfläche von Mikropartikeln, die mit Serum inkubiert waren, befindet, unterstützt. Für apoptotische Zellen wurde gezeigt, dass die Komplementaktivierung für die Aufnahme durch Makrophagen und dendritische Zellen eine wichtige Rolle spielt (Mevorach et al., 1998; Takizawa et al., 1996; Verbovetski et al., 2002). Auf der Oberfläche

apoptotischer Zellen präsentiertes Phosphatidylserin ist zumindest teilweise in die Aktivierung der Komplementkaskade integriert und trägt zur Opsonierung der Plasmamembran-Oberfläche mit Komplementkomponenten, wie etwa iC3b bei (Wang et al., 1993; Mevorach, 2000). Auch Phosphatidylserin auf Liposomen wird für die Aktivierung des alternativen Komplementweges verantwortlich gemacht. Auch die Beseitigung von Liposomen durch Makrophagen des reticuloendothelialen Systems ist komplementabhängig (Liu et al., 1995). Neben Phosphatidylserin werden auch andere Phospholipide, wie z. B. Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin, als Initiatoren für eine Aktivierung der Komplementkaskade, die durch einen Antikörper-unabhängigen Mechanismus abläuft, diskutiert (Kovacsovic et al., 1985; Mold, 1989; Wang et al., 1993).

Die Aktivierung der Komplementkaskade und die Verstärkung über den alternativen Weg führen zur Spaltung von C3 in C3a und C3b. Regulatorische Komplementkomponenten, wie etwa die Serinprotease Faktor I, spalten das C3b Fragment in iC3b, welches inaktiv ist und auf der Oberfläche von Pathogenen durch den Komplementrezeptor CR2 erkannt wird (Law and Dodds, 1997). Die Opsonierung der Mikropartikel durch iC3b führte zu der Annahme, dass iC3b die Zunahme des Serum-Transfer verursachte. Durch einen Antikörper, der gegen iC3b gerichtet ist, konnte allerdings keine Hemmung der Mikropartikel-Aufnahme durch B-Zellen beobachtet werden. Allerdings ist nicht bekannt, ob der verwendete iC3b-Antikörper inhibitorisch ist.

In der Erkennung von opsonierten Pathogenen spielen die Komplementrezeptoren eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass der Komplementrezeptor CR2 in die Aufnahme von iC3b-opsonierten Mikropartikeln durch B-Zellen involviert ist. Die für C3-Fragmente verantwortlichen Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR2 (CD21) binden C3b, C4b, C1q bzw. C3d, C3dg und iC3b. CR1 wird auf B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten exprimiert und führt die Beseitigung von C3-opsonierten Immunkomplexen aus dem Blutkreislauf herbei. CR2 ist hauptsächlich auf B-Zellen und folliculären dendritischen Zellen zu finden (Ahearn and Fearon, 1989; Reynes et al., 1985) und dient als bevorzugter Rezeptor für C3dg und iC3b (Mold et al., 1988; Schwendinger et al., 1997).

Der spezifische Transfer von Mikropartikeln in Serum konnte durch einen blockierenden Antikörper gegen CD21 (Klon FE8) auf B-Zellen um 57 % inhibiert werden. Obgleich sich in Bindungsanalysen mit diesem Rezeptor gezeigt hat, dass auch auf Monozyten CD21 exprimiert ist, konnte der durch Serum hervorgerufene leicht verstärkende Transfer auf CD14⁺ Monozyten nicht durch den Antikörper gegen CD21 reduziert werden. Auf Monozyten wurde nur durch eine Inkubation mit dem Antikörper gegen CD35 (CR1) ein um 22 % herabgesetzter Transfer in Serum beobachtet. Im Gegensatz zu B-Zellen

spielen Serum und die Komplementkomponenten beim Mikropartikel-Transfer auf Monozyten eine geringe Rolle.

Wie schon bei den Experimenten mit Calcium, Annexin V, NEM, Heparin und Cytochalasin D dargestellt, werden auch durch Serum und die Komplementkomponenten die unterschiedlichen Mechanismen, die zum Transfer von Mikropartikeln auf Lymphozyten und Monozyten beitragen, erkennbar.

6.6 Opsonierte Mikropartikel reduzieren die B-Zell-Aktivierung

Die Interaktion zwischen iC3b-opsonierten Mikropartikeln und B-Zellen resultierte in einer Reduktion der Aktivierung von B-Zellen, was durch die Analyse der Expression von MHC-Klasse II-Molekülen (HLA-DR), CD86, CD25 und der Bestimmung der Zellgröße (FSC) gezeigt wurde. Unter basalen Bedingungen (d.h. ohne Stimulation der B-Zellen mit PMA) konnte nach Aufnahme der iC3b-opsonierten Mikropartikel durch B-Zellen eine herunterregulierte Expression von HLA-DR und CD86, aber eine gleich bleibende CD25-Expression und Zellgröße ermittelt werden. Ein durch PMA-induzierter Anstieg der Zellgröße und der Expression von CD25 wurde nach dem Transfer von Mikropartikeln, die mit Serum behandelt waren, signifikant reduziert. Verbovetski et al. konnten ähnliche Ergebnisse mit apoptotischen Zellen beschreiben. Dendritische Zellen reduzierten nach Kontakt mit iC3b-opsonierten apoptotischen Zellen die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen und CD86 (Verbovetski et al., 2002). Die aus diesen Experimenten hervorgegangenen Resultate, lassen vermuten, dass der Transfer von Mikropartikeln auf Leukozyten bei der Vorbeugung von Immunantworten gegen Antigene, ebenso wie bei Gewebeschädigungen oder Entzündungen, beteiligt ist.

6.7 Schlußfolgerung

Nach Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse wird in dieser Arbeit mehrfach gezeigt, dass unterschiedliche Mechanismen in den Transfer von Mikropartikeln auf verschiedene Akzeptorzellen involviert sind und vielfältige zell-spezifische Effekte auslösen. Die Aufnahme von Mikropartikeln durch B-Zellen ist Komplement-abhängig, hingegen durch Monozyten weitgehend Komplement-unabhängig, dafür jedoch hemmbar durch Blockade von Annexin V, durch Calciumentzug, sowie durch Modifikation von Thiol-Gruppen. Jedoch wird der Transfer von Mikropartikeln weder durch SNARE-Proteine, noch durch Tetraspanine induziert.

Die Daten in dieser Arbeit veranschaulichen zudem, dass Serum-opsonierte Mikropartikel die zelluläre Aktivität von Monozyten und B-Zellen insofern modifizieren, dass diese Akzeptorzellen nach der Aufnahme von Mikropartikeln einen anti-inflammatorischen Phänotyp präsentieren. Eine putative Funktion von Mikropartikeln wäre hierbei pro-inflammatorische Signale, die von Gewebeerletzungen oder Entzündungen herrühren, im Gleichgewicht zu halten.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Mechanismen des Transfers von Mikropartikeln auf verschiedene Akzeptorzellen und die funktionellen Veränderungen der Akzeptorzellen nach der Aufnahme von Mikropartikeln. Mikropartikel werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen freigesetzt und modifizieren durch den Transfer von Membranmolekülen und zytoplasmatischen Komponenten die Akzeptorzellen. Die hier charakterisierten Mikropartikel wurden unter physiologischen Voraussetzungen gebildet und präsentieren neben spezifischen Rezeptoren der Ursprungszelle auch Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Obgleich diese Mikropartikel Merkmale von apoptotischen Zellen aufweisen, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Vesikel von apoptotischen Zellen handelt.

Um die Funktion bzw. den Mechanismus des Mikropartikel-Transfers aufzuklären, wurden verschiedene Zelltypen als Akzeptoren untersucht. Ein Transfer von Mikropartikeln, die von Kato-Zellen gewonnen wurden, konnte auf PBMCs (Monozyten, B- und T-Zellen) eindeutig nachgewiesen werden. Aber auch PBMCs sind befähigt Mikropartikel zu generieren. Diese von PBMCs freigesetzten Mikropartikel wurden auf Monozyten und Lymphozyten, so wie auf Endothelzellen transferiert. Transfer-Versuche bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigten, dass physiologische Voraussetzungen von 37°C gegeben sein müssen und der Transfer schon nach 30 min zu registrieren war. Diese Transfer-Daten wurden im Durchflußzytometer analysiert und mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden bestätigt.

Als Basis für die Charakterisierung des Transfers wurden bisher beschriebene Mechanismen der Vesikelfusion herangezogen. Bei den durchgeführten Untersuchungen ergaben sich unterschiedliche Intensitäten des Transfers bei Monozyten und Lymphozyten, und ließen auf verschiedene Mechanismen bei der Mikropartikel-Aufnahme schließen. Unter Verwendung von EDTA bzw. Lanthanchlorid und Zinkchlorid, welche extrazelluläres Calcium binden bzw. intrazelluläre Calcium-Freisetzungen hemmen, wurde die Notwendigkeit von Calcium beim Transfer auf Monozyten, jedoch nicht auf Lymphozyten verdeutlicht. Versuche mit Cytochalasin D und Thiol-Reagenzien zeigten, dass die Mikropartikel-Aufnahme durch Monozyten ein intaktes Zytoskelett, verschiedene Enzymaktivitäten und Fusionsproteine voraussetzt. Der Transfer auf Monozyten scheint im Vergleich zu Lymphozyten ein aktiver Prozess zu sein. Die weitere Charakterisierung des Transfermechanismus mit Fusionsproteinen zeigte eine Beteiligung des Phosphatidylserin-bindenden Annexin V bei der Mikropartikel-Aufnahme durch Monozyten. Bindungsanalysen konnten eine Existenz von Annexin V auf Monozyten und Mikropartikel-absondernden Donorzellen darlegen. Auch durch einen Antikörper gegen Annexin V wurde der Transfer im Falle von Monozyten gehemmt.

Um die Bedeutung anderer Fusionsproteine beim Transfer zu untersuchen, wurde die Funktion von Tetraspaninen und SNARE-Molekülen in diesem Transfer-Modell analysiert. In den durchgeführten Experimenten konnten keine Hinweise gefunden werden, dass Tetraspanine oder SNARE-Moleküle am Mikropartikel-Transfer beteiligt sind.

Funktionelle Untersuchungen des Mikropartikel-Transfers auf Monozyten stellten eine Änderung des Cytokin-Profiles nach dem Transfer dar. Die Mikropartikel-Aufnahme bewirkte eine erhöhte Freisetzung des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 und setzte die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Cytokine GM-CSF und TNF- α herab.

Beim Transfer unter physiologischen Bedingungen stellte sich heraus, dass die Mikropartikel-Aufnahme durch B-Zellen Komplement-abhängig ist, im Gegensatz zu dem Transfer auf Monozyten, welcher nur geringfügig durch die Komplementkomponenten beeinflusst werden konnte. Die Inkubation der Mikropartikel mit Serum zeigte eine deutliche Opsonierung mit der Komplementkomponente iC3b. Der Transfer dieser opsonierten Mikropartikel auf B-Zellen wurde durch den Komplementrezeptor CR2 (CD21) vermittelt. Funktionelle Analysen des Transfers mit iC3b-opsonierten Mikropartikeln ergaben eine Reduktion der Aktivierung von B-Zellen. Dies wurde mittels durchflußzytometrischer Messungen der Expression von CD86, MHC-Klasse II-Molekülen (HLA-DR), CD25 und der Bestimmung der Zellgröße (FSC) dargestellt.

Diese Experimente beschreiben eine durch Mikropartikel verursachte zelluläre Aktivitätsänderung von Monozyten und B-Zellen, die mit einer anti-inflammatorischen Modifikation der Akzeptorzellen einhergeht. Mikropartikel könnten damit ähnlich wie apoptotische Zellen einen wichtigen Beitrag leisten, eine potentielle Autoimmunreaktion bei Entzündungsprozessen oder Gewebeschädigung zu kontrollieren.

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der Daten zum Mikropartikel-Transfer (\downarrow : reduzierter Transfer, \uparrow : verstärkter Transfer, \leftrightarrow : keine Änderung des Transfers)

	Mikropartikel-Transfer auf			Bemerkung
	Monozyten	Lymphozyten	B-Zellen	
Temperatur 37°C	\uparrow	\uparrow	/	
Temperatur 4°C	\downarrow	\leftrightarrow	/	im Vergleich zu 37°C
Zeit > 30 min	\uparrow	\uparrow	/	
Zeit < 30 min	\downarrow	\leftrightarrow	/	im Vergleich zu > 30 min
Cytochalasin D	\downarrow	\leftrightarrow	/	Donorzellen inkubiert
Annexin V-FITC / -Biotin	\downarrow	\leftrightarrow	/	bei Koinkub. vorhanden
Annexin V (rekombinant)	\leftrightarrow	(\downarrow)	/	bei Koinkub. vorhanden
α Annexin V	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	bei Koinkub. vorhanden
EDTA	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	bei Koinkub. vorhanden
LaCl ₃	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
ZnCl ₂	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
Heparin	\downarrow	\uparrow	/	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
Chondroitinsulfat A	\leftrightarrow	\leftrightarrow	/	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
N-ethylmaleimid	\downarrow ¹⁾	\uparrow ²⁾	/	¹⁾ Monozyten inkubiert ²⁾ Donorzellen inkubiert
HgCl ₂	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Akzeptorzellen inkubiert
α VAMP I	\leftrightarrow	\leftrightarrow	/	Akzeptorzellen inkubiert
Tetanus- und Botulinum-Toxin	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
Tetraspanine	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Donorzellen und Akzeptorzellen inkubiert
Phagozytose- Rezeptoren	\leftrightarrow	\leftrightarrow	/	Akzeptorzellen inkubiert
Komplement- komponenten	(\uparrow)	\leftrightarrow	\uparrow	Donorzellen inkubiert
α CD21 (α CR2)	\leftrightarrow	\leftrightarrow	\downarrow	Akzeptorzellen inkubiert
α CD35 (α CR1)	\downarrow	\leftrightarrow	\leftrightarrow	Akzeptorzellen inkubiert

8 Literaturverzeichnis

- Abid Hussein M. N., Meesters E. W., Osmanovic N., Romijn F. P., Nieuwland R. and Sturk A. (2003) Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* **1**, 2434-43.
- Aderem A. A., Wright S. D., Silverstein S. C. and Cohn Z. A. (1985) Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J Exp Med* **161**, 617-22.
- Ahearn J. M. and Fearon D. T. (1989) Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol* **46**, 183-219.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. (1995) Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Allan D. and Thomas P. (1981) Ca²⁺-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation. *Biochem J* **198**, 433-40.
- Aramaki Y. (2000) Liposomes as immunomodulator--inhibitory effect of liposomes on NO production from macrophages. *Biol Pharm Bull* **23**, 1267-74.
- Arend W. P. (1993) Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* **54**, 167-227.
- Arm J. P. and Lee T. H. (1992) The pathobiology of bronchial asthma. *Adv Immunol* **51**, 323-82.
- Armstrong M. J., Storch J. and Dainiak N. (1988) Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in normal and transformed lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **946**, 106-12.
- Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reza R., Janowska-Wieczorek A. and Ratajczak M. Z. (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* **30**, 450-9.
- Balch W. E., Dunphy W. G., Braell W. A. and Rothman J. E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* **39**, 405-16.
- Baldwin G. C. (1992) The biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effects on hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Dev Biol* **151**, 352-67.
- Barnes P. J. (1994) Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, S42-9.
- Barry O. P., Pratico D., Lawson J. A. and FitzGerald G. A. (1997) Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* **99**, 2118-27.
- Barry O. P., Pratico D., Savani R. C. and FitzGerald G. A. (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**, 136-44.
- Barz D., Goppelt M., Szamel M., Schirmacher V. and Resch K. (1985) Characterization of cellular and extracellular plasma membrane vesicles from a non-metastasizing lymphoma (Eb) and its metastasizing variant (ESb). *Biochim Biophys Acta* **814**, 77-84.
- Baumert M., Maycox P. R., Navone F., De Camilli P. and Jahn R. (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *Embo J* **8**, 379-84.

- Beaudoin A. R. and Grondin G. (1991) Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta* **1071**, 203-19.
- Beckers C. J., Block M. R., Glick B. S., Rothman J. E. and Balch W. E. (1989) Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* **339**, 397-8.
- Bennett M. K., Calakos N. and Scheller R. H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257**, 255-9.
- Berckmans R. J., Neuwland R., Boing A. N., Romijn F. P., Hack C. E. and Sturk A. (2001) Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* **85**, 639-46.
- Beyers E. M., Comfurius P., Dekkers D. W. and Zwaal R. F. (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 317-30.
- Blanchard N., Lankar D., Faure F., Regnault A., Dumont C., Raposo G. and Hivroz C. (2002) TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* **168**, 3235-41.
- Boucheix C. and Rubinstein E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1189-205.
- Bromley S. K., Burack W. R., Johnson K. G., Somersalo K., Sims T. N., Sumen C., Davis M. M., Shaw A. S., Allen P. M. and Dustin M. L. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**, 375-96.
- Bucki R., Bachelot-Loza C., Zachowski A., Giraud F. and Sulpice J. C. (1998) Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry* **37**, 15383-91.
- Burdin N., Peronne C., Banchereau J. and Rousset F. (1993) Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med* **177**, 295-304.
- Byrne A. and Reen D. J. (2002) Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* **168**, 1968-77.
- Capila I., Hernaiz M. J., Mo Y. D., Mealy T. R., Campos B., Dedman J. R., Linhardt R. J. and Seaton B. A. (2001) Annexin V--heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate--mediated assembly on cell surfaces. *Structure (Camb)* **9**, 57-64.
- Carroll M. C. (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 545-68.
- Chang T. L., Shea C. M., Urioste S., Thompson R. C., Boom W. H. and Abbas A. K. (1990) Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. III. Responses of IL-2- and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. *J Immunol* **145**, 2803-8.
- Chen M. S., Tung K. S., Coonrod S. A., Takahashi Y., Bigler D., Chang A., Yamashita Y., Kincade P. W., Herr J. C. and White J. M. (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11830-5.
- Chen Y. A. and Scheller R. H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 98-106.
- Chizzolini C., Chicheportiche R., Burger D. and Dayer J. M. (1997) Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* **27**, 171-7.

- Chonn A., Cullis P. R. and Devine D. V. (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* **146**, 4234-41.
- Clevers H., Alarcon B., Wileman T. and Terhorst C. (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* **6**, 629-62.
- Coleman M. L., Sahai E. A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. and Olson M. F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-45.
- Combes V., Simon A. C., Grau G. E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J. and Dignat-George F. (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* **104**, 93-102.
- Comfurius P., Senden J. M., Tilly R. H., Schroit A. J., Bevers E. M. and Zwaal R. F. (1990) Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* **1026**, 153-60.
- Comis A. and Easterbrook-Smith S. B. (1986) Inhibition of serum complement haemolytic activity by lipid vesicles containing phosphatidylserine. *FEBS Lett* **197**, 321-7.
- Cooper M. D. (1987) Current concepts. B lymphocytes. Normal development and function. *N Engl J Med* **317**, 1452-6.
- Creutz C. E. (1992) The annexins and exocytosis. *Science* **258**, 924-31.
- Daha M. R., Fearon D. T. and Austen K. F. (1976) C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. *J Immunol* **117**, 630-4.
- Dainiak N. (1991) Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth. *Blood* **78**, 264-76.
- Dainiak N., Riordan M. A., Strauss P. R., Feldman L. and Kreczko S. (1988) Contractile proteins participate in release of erythroid growth regulators from mononuclear cells. *Blood* **72**, 165-71.
- Davis A. T., Estensen R. and Quie P. G. (1971) Cytochalasin B. 3. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *Proc Soc Exp Biol Med* **137**, 161-4.
- Davis T. N. (1992) What's new with calcium? *Cell* **71**, 557-64.
- de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C. G. and de Vries J. E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**, 1209-20.
- Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M. G., Biagiotti R. and Romagnani S. (1993) Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* **150**, 353-60.
- Delon J. and Germain R. N. (2000) Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* **10**, R923-33.
- Dempsey P. W., Allison M. E., Akkaraju S., Goodnow C. C. and Fearon D. T. (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**, 348-50.
- Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R. E., Hill C. M., Davis C. B., Peiper S. C., Schall T. J., Littman D. R. and Landau N. R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-6.

- Diamant M., Nieuwland R., Pablo R. F., Sturk A., Smit J. W. and Radder J. K. (2002) Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **106**, 2442-7.
- Diamant M., Tushuizen M. E., Sturk A. and Nieuwland R. (2004) Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* **34**, 392-401.
- Diaz R., Mayorga L. S., Weidman P. J., Rothman J. E. and Stahl P. D. (1989) Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* **339**, 398-400.
- Ehlers M. R. (2000) CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* **2**, 289-94.
- Ehrlich P. und Morgenroth J. (1899) Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berl Klin Waschr* **36**, 6-9.
- Emans N., Gorvel J. P., Walter C., Gerke V., Kellner R., Griffiths G. and Gruenberg J. (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* **120**, 1357-69.
- Escola J. M., Kleijmeer M. J., Stoorvogel W., Griffith J. M., Yoshie O. and Geuze H. J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121-7.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M. L. and Henson P. M. (1998a) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **5**, 551-62.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Konowal A., Freed P. W., Westcott J. Y. and Henson P. M. (1998b) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 890-8.
- Fadok V. A., Bratton D. L., Rose D. M., Pearson A., Ezekewitz R. A. and Henson P. M. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90.
- Fadok V. A. and Chimini G. (2001) The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* **13**, 365-72.
- Fadok V. A., de Cathelineau A., Daleke D. L., Henson P. M. and Bratton D. L. (2001) Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 1071-7.
- Fearon D. T. and Carroll M. C. (2000) Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* **18**, 393-422.
- Fiorentino D. F., Zlotnik A., Mosmann T. R., Howard M. and O'Garra A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* **147**, 3815-22.
- Fischer E., Delibrias C. and Kazatchkine M. D. (1991) Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* **146**, 865-9.
- Fittipaldi A., Ferrari A., Zoppe M., Arcangeli C., Pellegrini V., Beltram F. and Giacca M. (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* **278**, 34141-9.
- Frank M. M. and Fries L. F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* **12**, 322-6.

- Frenkel E. J., Kuypers F. A., Op den Kamp J. A., Roelofsen B. and Ott P. (1986) Effect of membrane cholesterol on dimyristoylphosphatidylcholine-induced vesiculation of human red blood cells. *Biochim Biophys Acta* **855**, 293-301.
- Freyssinet J. M. (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* **1**, 1655-62.
- Gallucci S., Lolkema M. and Matzinger P. (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1249-55.
- Gasser O. and Schifferli J. A. (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* **104**, 2543-8.
- Gazzinelli R. T., Oswald I. P., James S. L. and Sher A. (1992) IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* **148**, 1792-6.
- George J. N., Pickett E. B., Saucerman S., McEver R. P., Kunicki T. J., Kieffer N. and Newman P. J. (1986) Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* **78**, 340-8.
- George J. N., Thoi L. L., McManus L. M. and Reimann T. A. (1982) Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* **60**, 834-40.
- Gerke V. and Moss S. E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 129-54.
- Gershov D., Kim S., Brot N. and Elkon K. B. (2000) C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* **192**, 1353-64.
- Gidon-Jeangirard C., Hugel B., Holl V., Toti F., Laplanche J. L., Meyer D. and Freyssinet J. M. (1999) Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* **162**, 5712-8.
- Gotow T., Sakata M., Funakoshi T. and Uchiyama Y. (1996) Preferential localization of annexin V to the axon terminal. *Neuroscience* **75**, 507-21.
- Gottlinger H. G., Funke I., Johnson J. P., Gokel J. M. and Riethmuller G. (1986) The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* **38**, 47-53.
- Gotze O. and Muller-Eberhard H. J. (1976) The alternative pathway of complement activation. *Adv Immunol* **24**, 1-35.
- Grazia Cappiello M., Sutterwala F. S., Trinchieri G., Mosser D. M. and Ma X. (2001) Suppression of Il-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. *J Immunol* **166**, 4498-506.
- Gruenberg J. and Emans N. (1993) Annexins in membrane traffic. *Trends Cell Biol* **3**, 224-7.
- Guo W., Sacher M., Barrowman J., Ferro-Novick S. and Novick P. (2000) Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* **10**, 251-5.
- Hammerberg C., Katiyar S. K., Carroll M. C. and Cooper K. D. (1998) Activated complement component 3 (C3) is required for ultraviolet induction of immunosuppression and antigenic tolerance. *J Exp Med* **187**, 1133-8.

- Hampton M. B., Vanags D. M., Porn-Ares M. I. and Orrenius S. (1996) Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. *FEBS Lett* **399**, 277-82.
- Hansel T. T., De Vries I. J., Carballido J. M., Braun R. K., Carballido-Perrig N., Rihs S., Blaser K. and Walker C. (1992) Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR. *J Immunol* **149**, 2130-6.
- Heidemann S. R., Kaech S., Buxbaum R. E. and Matus A. (1999) Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts. *J Cell Biol* **145**, 109-22.
- Henson P. M., Bratton D. L. and Fadok V. A. (2001) The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 627-33.
- Hirai Y. (2001) Epimorphin as a morphogen: Does a protein for intracellular vesicular targeting act as an extracellular signaling molecule? *Cell Biol Int* **25**, 193-5.
- Hoffmann P. R., deCathelineau A. M., Ogden C. A., Leverrier Y., Bratton D. L., Daleke D. L., Ridley A. J., Fadok V. A. and Henson P. M. (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* **155**, 649-59.
- Hoffmann P. R., Kench J. A., Vondracek A., Kruk E., Daleke D. L., Jordan M., Marrack P., Henson P. M. and Fadok V. A. (2005) Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* **174**, 1393-404.
- Hofmann A., Benz J., Liemann S. and Huber R. (1997) Voltage dependent binding of annexin V, annexin VI and annexin VII-core to acidic phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1330**, 254-64.
- Hong K., Kinoshita T., Pramoongjago P., Kim Y. U., Seya T. and Inoue K. (1991) Reconstitution of C5 convertase of the alternative complement pathway with isolated C3b dimer and factors B and D. *J Immunol* **146**, 1868-73.
- Horstman L. L., Jy W., Jimenez J. J., Bidot C. and Ahn Y. S. (2004) New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* **53**, 210-30.
- Huber H., Polley M. J., Linscott W. D., Fudenberg H. H. and Muller-Eberhard H. J. (1968) Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G. *Science* **162**, 1281-3.
- Huber J., Vales A., Mitulovic G., Blumer M., Schmid R., Witztum J. L., Binder B. R. and Leitinger N. (2002) Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 101-7.
- Huber R., Schneider M., Mayr I., Romisch J. and Paques E. P. (1990) The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett* **275**, 15-21.
- Hugel B., Martinez M. C., Kunzelmann C. and Freyssinet J. M. (2005) Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology (Bethesda)* **20**, 22-27.
- Hunt J. M., Bommert K., Charlton M. P., Kistner A., Habermann E., Augustine G. J. and Betz H. (1994) A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* **12**, 1269-79.
- Huynh M. L., Fadok V. A. and Henson P. M. (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **109**, 41-50.

- Iida K., Nadler L. and Nussenzweig V. (1983) Identification of the membrane receptor for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody. *J Exp Med* **158**, 1021-33.
- Ilsenman D. E., Kells D. I., Cooper N. R., Muller-Eberhard H. J. and Pangburn M. K. (1981) Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* **20**, 4458-67.
- Ishitsuka R., Kojima K., Utsumi H., Ogawa H. and Matsumoto I. (1998) Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V, and VI. *J Biol Chem* **273**, 9935-41.
- Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M. and Narumiya S. (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* **57**, 976-83.
- Janatova J. and Gobel R. J. (1985) Activation and fragmentation of the third (C3) and the fourth (C4) components of complement: generation and isolation of physiologically relevant fragments C3c and C4c. *J Immunol Methods* **85**, 17-26.
- Janeway C. A. and Travers P. (1997) Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J., Baj-Krzyworzeka M., Reza R., Turner A. R., Ratajczak J., Emerson S. G., Kowalska M. A. and Ratajczak M. Z. (2001) Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* **98**, 3143-9.
- Joop K., Berckmans R. J., Nieuwland R., Berkhout J., Romijn F. P., Hack C. E. and Sturk A. (2001) Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* **85**, 810-20.
- Jy W., Jimenez J. J., Mauro L. M., Ahn Y. S., Newton K. R., Mendez A. J., Arnold P. I. and Schultz D. R. (2002) Agonist-induced capping of adhesion proteins and microparticle shedding in cultures of human renal microvascular endothelial cells. *Endothelium* **9**, 179-89.
- Kaneko N., Matsuda R., Hosoda S., Kajita T. and Ohta Y. (1996) Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **251**, 65-80.
- Kaplan G. (1977) Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand J Immunol* **6**, 797-807.
- Kenis H., van Genderen H., Bennaghmouch A., Rinia H. A., Frederik P., Narula J., Hofstra L. and Reutelingsperger C. P. (2004) Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem* **279**, 52623-9.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kim H. K., Song K. S., Park Y. S., Kang Y. H., Lee Y. J., Lee K. R., Ryu K. W., Bae J. M. and 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**, 184-91.
- Kim J., Cha J. H., Tisher C. C. and Madsen K. M. (1996) Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. *Am J Physiol* **270**, F575-92.
- Kim S. J., Gershov D., Ma X., Brot N. and Elkouss K. B. (2002) I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to

- binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* **196**, 655-65.
- Kita Y., Iwaki Y., Noguchi K., Tzakis A. G., Todo S., Fung J. J. and Starzl T. E. (1996) Daily serum inflammatory cytokine (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) monitoring in liver transplantation focusing on allograft rejection: a five-case report. *Transplant Proc* **28**, 1237-40.
- Kolowos W., Gaipl U. S., Sheriff A., Voll R. E., Heyder P., Kern P., Kalden J. R. and Herrmann M. (2005) Microparticles shed from different antigen-presenting cells display an individual pattern of surface molecules and a distinct potential of allogeneic T-cell activation. *Scand J Immunol* **61**, 226-33.
- Korb L. C. and Ahearn J. M. (1997) C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* **158**, 4525-8.
- Kosower N. S., Kosower E. M., Wertheim B. and Correa W. S. (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* **37**, 593-6.
- Kovacsovics T., Tschopp J., Kress A. and Isliker H. (1985) Antibody-independent activation of C1, the first component of complement, by cardiolipin. *J Immunol* **135**, 2695-700.
- Krych-Goldberg M. and Atkinson J. P. (2001) Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol Rev* **180**, 112-22.
- Law S. K. and Dodds A. W. (1997) The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci* **6**, 263-74.
- Li Z. (1999) The alphaMbeta2 integrin and its role in neutrophil function. *Cell Res* **9**, 171-8.
- Liu D., Liu F. and Song Y. K. (1995) Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochim Biophys Acta* **1235**, 140-6.
- Loffler S., Lottspeich F., Lanza F., Azorsa D. O., ter Meulen V. and Schneider-Schaulies J. (1997) CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol* **71**, 42-9.
- Lopez A. F., Williamson D. J., Gamble J. R., Begley C. G., Harlan J. M., Klebanoff S. J., Waltersdorff A., Wong G., Clark S. C. and Vadas M. A. (1986) Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* **78**, 1220-8.
- Mack M., Kleinschmidt A., Bruhl H., Klier C., Nelson P. J., Cihak J., Plachy J., Stangassinger M., Erfle V. and Schlondorff 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* **6**, 769-75.
- MacKenzie A., Wilson H. L., Kiss-Toth E., Dower S. K., North R. A. and Surprenant A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825-35.
- Majka M., Baj-Krzyworzeka M., Kijowski J., Reza R., Ratajczak J. and Ratajczak M. Z. (2001) In vitro expansion of human megakaryocytes as a tool for studying megakaryocytic development and function. *Platelets* **12**, 325-32.
- Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P. G., Freyssinet J. M. and 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**, 841-3.

- Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Leseche G., Freyssinet J. M. and Tedgui A. (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99**, 348-53.
- Marth T. and Kelsall B. L. (1997) Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med* **185**, 1987-95.
- Maxfield F. R. and McGraw T. E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-32.
- Mesri M. and Altieri D. C. (1998) Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* **161**, 4382-7.
- Mesri M. and Altieri D. C. (1999) Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 23111-8.
- Mevorach D. (2000) Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* **926**, 226-35.
- Mevorach D., Mascarenhas J. O., Gershov D. and Elkon K. B. (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* **188**, 2313-20.
- Mintz M., Rapaport R., Oleske J. M., Connor E. M., Koenigsberger M. R., Denny T. and Epstein L. G. (1989) Elevated serum levels of tumor necrosis factor are associated with progressive encephalopathy in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dis Child* **143**, 771-4.
- Mold C. (1989) Effect of membrane phospholipids on activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* **143**, 1663-8.
- Mold C., Nemerow G. R., Bradt B. M. and Cooper N. R. (1988) CR2 is a complement activator and the covalent binding site for C3 during alternative pathway activation by Raji cells. *J Immunol* **140**, 1923-9.
- Morelli A. E., Larregina A. T., Shufesky W. J., Zahorchak A. F., Logar A. J., Papworth G. D., Wang Z., Watkins S. C., Falo L. D., Jr. and Thomson A. W. (2003) Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* **101**, 611-20.
- Mosmann T. R. and Fong T. A. (1989) Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* **116**, 151-8.
- Muller-Eberhard H. J. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* **57**, 321-47.
- Myones B. L., Dalzell J. G., Hogg N. and Ross G. D. (1988) Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J Clin Invest* **82**, 640-51.
- Nauta A. J., Bottazzi B., Mantovani A., Salvatori G., Kishore U., Schwaeble W. J., Gingras A. R., Tzima S., Vivanco F., Egido J., Tijmsa O., Hack E. C., Daha M. R. and Roos A. (2003a) Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* **33**, 465-73.
- Nauta A. J., Raaschou-Jensen N., Roos A., Daha M. R., Madsen H. O., Borrias-Essers M. C., Ryder L. P., Koch C. and Garred P. (2003b) Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* **33**, 2853-63.
- Nauta A. J., Trouw L. A., Daha M. R., Tijmsa O., Nieuwland R., Schwaeble W. J., Gingras A. R., Mantovani A., Hack E. C. and Roos A. (2002) Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol* **32**, 1726-36.

- Navratil J. S., Watkins S. C., Wisnieski J. J. and Ahearn J. M. (2001) The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J Immunol* **166**, 3231-9.
- Nicholson D. W. and Thornberry N. A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306.
- Nicholson-Weller A. and Klickstein L. B. (1999) C1q-binding proteins and C1q receptors. *Curr Opin Immunol* **11**, 42-6.
- Nielsen C. H. and Leslie R. G. (2002) Complement's participation in acquired immunity. *J Leukoc Biol* **72**, 249-61.
- Nielsen C. H., Pedersen M. L., Marquart H. V., Proding W. M. and Leslie R. G. (2002) The role of complement receptors type 1 (CR1, CD35) and 2 (CR2, CD21) in promoting C3 fragment deposition and membrane attack complex formation on normal peripheral human B cells. *Eur J Immunol* **32**, 1359-67.
- Nieuwland R., Berckmans R. J., McGregor S., Boing A. N., Romijn F. P., Westendorp R. G., Hack C. E. and Sturk A. (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930-5.
- Nieuwland R., Berckmans R. J., Rotteveel-Eijkman R. C., Maquelin K. N., Roozendaal K. J., Jansen P. G., ten Have K., Eijnsman L., Hack C. E. and Sturk A. (1997) Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* **96**, 3534-41.
- Nomura S., Tandon N. N., Nakamura T., Cone J., Fukuhara S. and Kambayashi J. (2001) High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* **158**, 277-87.
- Ogden C. A., deCathelineau A., Hoffmann P. R., Bratton D., Ghebrehiwet B., Fadok V. A. and Henson P. M. (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* **194**, 781-95.
- Olas B., Lundell K., Holmsen H. and Fukami M. H. (2002) Biochemical properties of platelet microparticle membranes formed during exocytosis resemble organelles more than plasma membrane. *FEBS Lett* **525**, 29-32.
- Oling F., Santos J. S., Govorukhina N., Mazeres-Dubut C., Bergsma-Schutter W., Oostergetel G., Keegstra W., Lambert O., Lewit-Bentley A. and Brisson A. (2000) Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study. *J Mol Biol* **304**, 561-73.
- Oliver J. M., Albertini D. F. and Berlin R. D. (1976) Effects of glutathione-oxidizing agents on microtubule assembly and microtubule-dependent surface properties of human neutrophils. *J Cell Biol* **71**, 921-32.
- Oyler G. A., Higgins G. A., Hart R. A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F. E. and Wilson M. C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* **109**, 3039-52.
- Parnaik R., Raff M. C. and Scholes J. (2000) Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol* **10**, 857-60.
- Passlick B., Flieger D. and Ziegler-Heitbrock H. W. (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527-34.
- Pelham H. R. (2001) SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol* **11**, 99-101.

- Pfaffle M., Ruggiero F., Hofmann H., Fernandez M. P., Selmin O., Yamada Y., Garrone R. and von der Mark K. (1988) Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. *Embo J* **7**, 2335-42.
- Pistoia V. (1997) Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* **18**, 343-50.
- Platt N., da Silva R. P. and Gordon S. (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* **8**, 365-72.
- Porter R. R. and Reid K. B. (1978) The biochemistry of complement. *Nature* **275**, 699-704.
- Poutsiaika D. D., Taylor D. D., Levy E. M. and Black P. H. (1985) Inhibition of recombinant interferon-gamma-induced Ia antigen expression by shed B16 F10 melanoma cell membrane vesicles. *J Immunol* **134**, 145-50.
- Prodinger W. M., Schwendinger M. G., Schoch J., Kochle M., Larcher C. and Dierich M. P. (1998) Characterization of C3dg binding to a recess formed between short consensus repeats 1 and 2 of complement receptor type 2 (CR2; CD21). *J Immunol* **161**, 4604-10.
- Ranger A. M., Das M. P., Kuchroo V. K. and Glimcher L. H. (1996) B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *Int Immunol* **8**, 1549-60.
- Raynal P. and Pollard H. B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**, 63-93.
- Raz A. and Geiger B. (1982) Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. *Cancer Res* **42**, 5183-90.
- Reutelingsperger C. P. and van Heerde W. L. (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **53**, 527-32.
- Reynes M., Aubert J. P., Cohen J. H., Audouin J., Tricottet V., Diebold J. and Kazatchkine M. D. (1985) Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol* **135**, 2687-94.
- Reynolds H. Y., Atkinson J. P., Newball H. H. and Frank M. M. (1975) Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. *J Immunol* **114**, 1813-9.
- Riedel D., Lindemann A., Brach M., Mertelsmann R. and Herrmann F. (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce surface expression of interleukin-2 receptor p55-chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* **70**, 258-61.
- Romani N., Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O., Steinman R. M. and Schuler G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**, 83-93.
- Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu D. H., Kastelein R., Moore K. W. and Banchereau J. (1992) Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1890-3.
- Rovere P., Peri G., Fazzini F., Bottazzi B., Doni A., Bondanza A., Zimmermann V. S., Garlanda C., Fascio U., Sabbadini M. G., Rugarli C., Mantovani A. and Manfredi A. A. (2000) The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* **96**, 4300-6.
- Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Murphy S. L., Conover D. O., Poncz M., Ratajczak J., Gaulton G. N. and Ratajczak M. Z. (2003) Platelet- and megakaryocyte-derived

- microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* **17**, 33-42.
- Ryning F. W. and Remington J. S. (1978) Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infect Immun* **20**, 739-43.
- Sabatier F., Darmon P., Hugel B., Combes V., Sanmarco M., Velut J. G., Arnoux D., Charpiot P., Freyssinet J. M., Oliver C., Sampol J. and Dignat-George F. (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* **51**, 2840-5.
- Satta N., Toti F., Feugeas O., Bohbot A., Dachary-Prigent J., Eschwege V., Hedman H. and Freyssinet J. M. (1994) Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **153**, 3245-55.
- Savill J. (1997) Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* **53**, 491-508.
- Savill J. and Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-8.
- Schiavo G., Rossetto O. and Montecucco C. (1994) Clostridial neurotoxins as tools to investigate the molecular events of neurotransmitter release. *Semin Cell Biol* **5**, 221-9.
- Schumaker V. N., Zavodszky P. and Poon P. H. (1987) Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* **5**, 21-42.
- Schwendinger M. G., Spruth M., Schoch J., Dierich M. P. and Proding W. M. (1997) A novel mechanism of alternative pathway complement activation accounts for the deposition of C3 fragments on CR2-expressing homologous cells. *J Immunol* **158**, 5455-63.
- Sim R. B. and Malhotra R. (1994) Interactions of carbohydrates and lectins with complement. *Biochem Soc Trans* **22**, 106-11.
- Sim R. B. and Reid K. B. (1991) C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol Today* **12**, 307-11.
- Sims P. J. and Wiedmer T. (2001) Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* **86**, 266-75.
- Singh T. K. and Liu L. (2000) Modification of cysteine residues by N-ethylmaleimide inhibits annexin II tetramer mediated liposome aggregation. *Arch Biochem Biophys* **381**, 235-40.
- Sollner T., Bennett M. K., Whiteheart S. W., Scheller R. H. and Rothman J. E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-18.
- Steinman R. M., Witmer-Pack M. and Inaba K. (1993) Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* **329**, 1-9.
- Stewart R. J. and Marsden P. A. (1995) Biologic control of the tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *Am J Kidney Dis* **25**, 954-66.
- Stoorvogel W., Kleijmeer M. J., Geuze H. J. and Raposo G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* **3**, 321-30.
- Stuart L. M., Lucas M., Simpson C., Lamb J., Savill J. and Lacy-Hulbert A. (2002) Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* **168**, 1627-35.
- Sudhof T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.

- Sutterwala F. S., Noel G. J., Salgame P. and Mosser D. M. (1998) Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *J Exp Med* **188**, 217-22.
- Swairjo M. A. and Seaton B. A. (1994) Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 193-213.
- Tabibzadeh S. S., Kong Q. F. and Kapur S. (1994) Passive acquisition of leukocyte proteins is associated with changes in phosphorylation of cellular proteins and cell-cell adhesion properties. *Am J Pathol* **145**, 930-40.
- Tachibana I. and Hemler M. E. (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* **146**, 893-904.
- Tack B. F., Harrison R. A., Janatova J., Thomas M. L. and Prahl J. W. (1980) Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5764-8.
- Takizawa F., Tsuji S. and Nagasawa S. (1996) Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* **397**, 269-72.
- Taylor D. D. and Black P. H. (1985) Inhibition of macrophage Ia antigen expression by shed plasma membrane vesicles from metastatic murine melanoma lines. *J Natl Cancer Inst* **74**, 859-67.
- They C., Duban L., Segura E., Veron P., Lantz O. and Amigorena S. (2002) Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**, 1156-62.
- Thiel G., Sutter J. U. and Homann U. (2000) Ca²⁺-sensitive and Ca²⁺-insensitive exocytosis in maize coleoptile protoplasts. *Pflugers Arch* **439**, R152-3.
- Thompson C. (1995a) Protein proves to be a key link in innate immunity. *Science* **269**, 301-2.
- Thompson C. B. (1995b) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62.
- Tsan M. F., Newman B. and McIntyre P. A. (1976) Surface sulphhydryl groups and phagocytosis-associated oxidative metabolic changes in human polymorphonuclear leucocytes. *Br J Haematol* **33**, 189-204.
- Uhr J. W. and Vitetta E. S. (1973) Synthesis, biochemistry and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes. *Fed Proc* **32**, 35-40.
- van Blitterswijk W. J., Emmelot P., Hilkmann H. A., Oomenmeulemans E. P. and Inbar M. (1977) Differences in lipid fluidity among isolated plasma membranes of normal and leukemic lymphocytes and membranes exfoliated from their cell surface. *Biochim Biophys Acta* **467**, 309-20.
- van Heerde W. L., Sakariassen K. S., Hemker H. C., Sixma J. J., Reutelingsperger C. P. and de Groot P. G. (1994) Annexin V inhibits the procoagulant activity of matrices of TNF-stimulated endothelium under blood flow conditions. *Arterioscler Thromb* **14**, 824-30.
- Verbovetski I., Bychkov H., Trahtemberg U., Shapira I., Hareuveni M., Ben-Tal O., Kutikov I., Gill O. and Mevorach D. (2002) Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* **196**, 1553-61.
- Vogel S. S. and Zimmerberg J. (1992) Proteins on exocytic vesicles mediate calcium-triggered fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4749-53.
- Voll R. E., Herrmann M., Roth E. A., Stach C., Kalden J. R. and Girkontaite I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-1.

- Wang R. H., Phillips G., Jr., Medof M. E. and Mold C. (1993) Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *J Clin Invest* **92**, 1326-35.
- Warringa R. A., Koenderman L., Kok P. T., Kreukniet J. and Bruijnzeel P. L. (1991) Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* **77**, 2694-700.
- Weber T., Zemelman B. V., McNew J. A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Sollner T. H. and Rothman J. E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-72.
- Willett B., Hosie M., Shaw A. and Neil J. (1997) Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol* **78 (Pt 3)**, 611-8.
- Williamson P., Bevers E. M., Smeets E. F., Comfurius P., Schlegel R. A. and Zwaal R. F. (1995) Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* **34**, 10448-55.
- Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**, 269-88.
- Wright S. D., Craigmyle L. S. and Silverstein S. C. (1983) Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b- and C3bi-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med* **158**, 1338-43.
- Wyllie A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-6.
- Ziegler-Heitbrock H. W., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelzer F., Schutt C., Passlick B. and Pforte A. (1993) The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* **23**, 2053-8.
- Zwaal R. F. and Schroit A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-32.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Matthias Mack danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Betreuung meiner Dissertationsarbeit und für die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Detlef Schlöndorff danke ich für die ständige Gesprächsbereitschaft, sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel möchte ich für die Aufnahme als externe Doktorandin und die Vertretung meiner Arbeit in der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe der Klinischen Biochemie danke ich für die freundliche und freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die hilfreichen Assistenzen. Vor allem danke ich Herrn Dr. Bruno Luckow, der die Laborarbeit durch seine vorzügliche Labororganisation sehr unterstützte, und Herrn PD Dr. Peter Nelson, der immer wieder viele Ideen und Anregungen geliefert hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Martin Schneider, Simone Blattner, Tamara Rupp, Anke Mojaat und Alex Wechselberger für die vielen nützlichen Ratschläge, sowie die kleinen und großen Hilfen bedanken. Besonderer Dank geht an all jene, die mit ihrer Blutspende zur Durchführung der Experimente entscheidend beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt vor allem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichen haben, mir stets zur Seite standen und mich in jeder Hinsicht tatkräftig unterstützt haben. Bei meiner Schwester möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir immer wieder Mut gemacht hat. Und natürlich gilt meinem Verlobten Jürgen ganz besonderer Dank, für alles, was er für mich getan hat; aber vor allem dafür, dass es ihn gibt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Köppler, Barbara Maria
Geburtsdatum: 03.06.1973
Geburtsort: Heilbronn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1979 - 1983 Grundschule Adelsheim
1983 - 1989 Gymnasium Möckmühl
1989 - 1990 St. Audries School, Taunton / England
1990 - 1993 Gymnasium Möckmühl
05/1993 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

08/1993 - 07/1995 Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin,
Jörg-Zürn-Gewerbeschule / Überlingen

10/1995 - 07/1997 Grundstudium der Agrarbiologie/ Universität Hohenheim
09/1997 - 09/2000 Hauptstudium der Agrarbiologie/ Universität Hohenheim
Hauptfächer: Tierhygiene/Tiermedizin und Physiologie

10/1999 - 09/2000 Diplomarbeit zum Thema „Identifizierung von
Bindungspartnern spezieller PDZ-Domänen-Proteine
olfaktorischer Sinneszellen“ am Institut für Physiologie,
Universität Hohenheim

09/2000 Abschluss des Diplomstudiengangs Agrarbiologie an der
Universität Hohenheim

12/2000 Beginn der Promotion bei Herrn Prof. D. Schlöndorff und
Herrn Prof. M. Mack am Institut für Klinische Biochemie,
Medizinische Poliklinik der LMU München

Praktika / Studienbegleitende Tätigkeiten:

- 06/1998 - 09/1998 Praktikum an der II. Medizinischen Tierklinik der Universität München bei Herrn Prof. Dr. W. Klee
- 01/1999 - 09/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Universität Hohenheim

Publikationen und Posterpräsentationen:

Paysan J., Fleischer J, **Köppler B.**, Breer H. (Abstract u. Posterpräsentation): Putative Scaffolding Proteins in Olfactory Sensory Neurons. Meeting of the German Society for Cell Biology 2000, Karlsruhe. EJCB, Suppl. 50, Vol. 79, 2000

Paysan J., Fleischer J., **Köppler B.**, Elsässer R., Hanke W. und Breer H. (Posterpräsentation): Putative Scaffolding Proteins in Olfactory Neurons. 93. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 2000 in Bonn

Köppler B., Schlöndorff D. und Mack M. (eingereicht), Differential and complement dependent transfer of microparticles to B cells and monocytes – anti-inflammatory properties of microparticles.

Wissenschaftliche Kurse:

Versuchstierkundlicher Kurs des TIZ-Bifo (Tierschutzinformationszentrum für die biomedizinische Forschung der LMU München)

