

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner, Ph.D. (Melbourne))

**Die Bedeutung des Bakterien-assoziierten Zelltods in Phagozyten
für die Entwicklung einer anti-bakteriellen Immunantwort**

Julia Scheffel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
2. Priv.-Doz. Dr. St. Bauer
3. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 02.08.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 8 |
| I. Einleitung | 10 |
| 1.1 Apoptose | 10 |
| 1.1.1 Morphologie der Apoptose | 10 |
| 1.1.2 Mechanismen der Apoptose | 10 |
| 1.1.3 Bakterien-induzierte Apoptose | 12 |
| 1.2 Nekrose | 12 |
| 1.2.1 Morphologie nekrotischer Zellen | 13 |
| 1.2.2 Nekrose-Stimuli..... | 13 |
| 1.2.3 Mechanismus der Nekrose | 14 |
| 1.2.3.1 Extrazelluläre Mediatoren, Liganden und Rezeptoren..... | 14 |
| 1.2.3.2 Ionen und Lipide | 15 |
| 1.2.3.3 PARP..... | 15 |
| 1.2.3.4 Redox-Signale..... | 16 |
| 1.2.3.5 Proteinkinasen..... | 16 |
| 1.2.3.6 Proteine der Bcl-2-Familie | 17 |
| 1.2.3.7 Hitze-Schock-Proteine | 17 |
| 1.2.3.8 Mitochondrien..... | 17 |
| 1.2.3.9 Proteasen | 18 |
| 2. Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen | 18 |
| 2.1 Mechanismen der Phagozytose | 19 |
| 2.1.1 Externalisation von Phosphatidylserin und Aufnahme durch den Phosphatidylserinrezeptor: ein nicht-immunogener Prozess? | 19 |
| 2.1.2 Beteiligung von Kollektinen und Komplement an der Opsonisierung und Aufnahme toter Zellen – ein immunogener Prozess? | 21 |
| 2.1.3 Weitere Liganden und Rezeptoren für die Aufnahme apoptotischer Zellen . | 23 |
| 2.2 Bedeutung der Aufnahme toter Zellen durch professionelle Phagozyten | 23 |
| 3. Dendritische Zellen – Schlüsselstellen in der Entwicklung einer Immunantwort... | 25 |
| 3.1 Dendritische Zellen und ihre Fähigkeit zur Kreuz-Präsentation | 25 |
| 3.1.1 Aufnahme von Antigenen zur Kreuz-Präsentation | 26 |
| 3.1.2 Mechanismus der Kreuz-Präsentation | 26 |
| 3.2. Dendritische Zellen: Induktion einer Immunantwort oder von Toleranz? | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1 Reif oder unreif – zwei verschiedene Stadien der Dendritischen Zellen | 28 |
| 3.2.2 Konsequenzen der Aufnahme apoptotischer und nekrotischer Zellen | 29 |
| 4. Fragestellung | 31 |
| II. Material und Methoden | 33 |
| 1. <i>Material</i> | 33 |
| 1. 1 Geräte | 33 |
| 1.2. Chemikalien | 33 |
| 1.3. Antikörper | 35 |
| 1.4. Lösungen, Stammlösungen und Puffer | 36 |
| 1.5. Medien | 38 |
| 1.5.1 Medien für Bakterienkultur | 38 |
| 1.5.2 Medien für Zellkultur | 38 |
| 1.6. Zelllinien | 38 |
| 1.7. Bakterienstämme | 39 |
| 1.8. Virus | 39 |
| 1.9. Zellkulturartikel | 39 |
| 1.10. Sonstige Materialien | 39 |
| 1.11. Plasmide | 40 |
| 2. <i>Methoden</i> | 40 |
| 2.1 Herstellung von primären dendritischen Zellen und Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen | 40 |
| 2.2. Transfektion von Zellen durch Elektroporation | 42 |
| 2.3. Western-Blotting | 42 |
| 2.4. Zelltodinduktion | 44 |
| 2.4.1 Zelltod durch UV-Bestrahlung oder Behandlung mit Staurosporin | 44 |
| 2.4.2 Koinkubation von Makrophagen mit Bakterien | 45 |
| 2.5. Zelltod – Untersuchungen | 45 |
| 2.5.1 Hoechst – Färbung zum Nachweis von Apoptose | 45 |
| 2.5.2 Eosin / Trypanblau – Vitalfärbungen | 46 |
| 2.5.3 Annexin V / Propidiumiodid-Färbung | 46 |
| 2.6. Aufnahmeassay | 47 |
| 2.6.1 Färbung der Zellen für Koinkubation | 47 |
| 2.6.2 Koinkubation von dendritischen Zellen und Makrophagen | 48 |
| 2.7. Untersuchung des Reifungszustandes dendritischer Zellen | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 2.7.1 Koinkubation von dendritischen Zellen und Makrophagen für Reifungsuntersuchung der dendritischen Zellen beziehungsweise Kreuz-Präsentation | 49 |
| 2.7.2 Färbung von dendritischen Zellen nach Oberflächenmarkern..... | 49 |
| 2.8. Durchflusszytometrie | 50 |
| 2.9 TNF - ELISA | 50 |
| 2.10 Präsentationsassay | 52 |
| 2.11 Infektion von Makrophagen mit dem Vaccinia-Virus MVA | 53 |
| III. Ergebnisse | 54 |
| 1. Zelltod in Makrophagen | 54 |
| 1.1 Zelltod in Makrophagen nach Kontakt zu <i>E.coli</i> Bakterien..... | 54 |
| 1.1.1 Bereits vier bis sechs Stunden nach Bakterienkontakt stirbt ein Teil der Makrophagen durch Nekrose..... | 54 |
| 1.1.2 Zu späteren Zeitpunkten nach Bakterienkontakt tritt Apoptose auf..... | 57 |
| 1.1.3 Apoptose und Nekrose: Ist ein Nebeneinander dieser beiden Prozesse möglich?..... | 58 |
| 1.1.4 Apoptose, aber nicht Nekrose kann blockiert werden durch Caspaseninhibition oder Überexpression von Bcl-2..... | 60 |
| 1.1.5 Durch hitzeinaktivierte <i>E.coli</i> Bakterien kann zwar Nekrose, aber nicht Apoptose in Makrophagen ausgelöst werden | 62 |
| 1.1.6 Der nekrotische Zelltod in RAW Makrophagen nach Bakterienkontakt konnte mit butyliertem Hydroxyanisol nicht blockiert werden..... | 63 |
| 1.2 Zelltod nach Infektion mit dem Vaccinia-Virus MVA | 64 |
| 2. Aufnahme toter Makrophagen durch phagozytierende Zellen | 66 |
| 2.1 Dendritische Zellen können effektiv tote Zellen in ihrer Umgebung aufnehmen . | 66 |
| 2.1.1 Aufnahme apoptotischer Zellen..... | 68 |
| 2.1.2 Aufnahme nekrotischer Zellen..... | 69 |
| 2.1.3 MAP-Kinase- und Proteasom-Inhibitoren haben Einfluss auf die Apoptoseraten in <i>E.coli</i> behandelten Makrophagen, jedoch nicht auf deren Aufnahme durch dendritische Zellen..... | 72 |
| 2.1.4 Werden Makrophagen vor Zelltodinduktion aktiviert, ändert dies nicht die Apoptoseraten beziehungsweise das Aufnahmeverhalten durch dendritische Zellen | 74 |
| 2.2 Makrophagen phagozytieren tote umliegende Zellen | 76 |

| | |
|--|-----|
| 2.3 Phosphatidylserin-Exposition auf nekrotischen Zellen..... | 77 |
| 3. Reifungszustand dendritischer Zellen nach Phagozytose | 78 |
| 3.1 Inkubation mit aktivierten apoptotischen Zellen führt zur Reifung von dendritischen Zellen..... | 79 |
| 3.2 Der Überstand der aktivierten toten Makrophagen ist ausreichend zur Aktivierung von dendritischen Zellen..... | 81 |
| 3.3 Die Aktivierung ist nicht zurückzuführen auf erhöhte TNF Freisetzung aus sterbenden aktivierten Zellen..... | 82 |
| 4. Dendritische Zellen können aufgenommenes Antigen an CD8 ⁺ T-Zellen kreuz- präsentieren..... | 83 |
| IV. Diskussion | 87 |
| 1. Bakterien-induzierter Zelltod in Phagozyten | 87 |
| 1.1 Induktion von apoptotischem Zelltod in Phagozyten..... | 87 |
| 1.2 Induktion von nekrotischem Zelltod in Phagozyten..... | 88 |
| 1.2.1 Mechanismus der Nekrose in unserem Modell | 88 |
| 1.2.1.1 Rolle der Stresskinase p38 und einer Überexpression von Bcl-2..... | 88 |
| 1.2.1.2 Eine mögliche Bedeutung von Caspasen für den nekrotischen Zelltod?..... | 89 |
| 1.2.1.3 Induktion von Nekrose über Toll like Rezeptoren | 91 |
| 1.2.2 Apoptose und Nekrose – völlig gegensätzliche Formen des Zelltods? | 92 |
| 1.2.3 Nekrose – ein physiologisch relevanter Prozess?..... | 94 |
| 2. Aufnahme toter Zellen durch Phagozyten..... | 95 |
| 2.1 Zelltod durch Nekrose ist ausreichend für eine schnelle und effektive Aufnahme durch phagozytierende Zellen | 95 |
| 2.2 Mechanismus der Phagozytose nekrotischer Zellen | 97 |
| 2.2.1 Phosphatidylserinexposition auf nekrotischen Zellen..... | 97 |
| 2.2.2 Rolle von MFG-E8 für die Aufnahme nekrotischer Zellen durch Makrophagen | 98 |
| 3. Auswirkung des Bakterien-induzierten Zelltods in Makrophagen auf die Entwicklung einer anti-bakteriellen Immunantwort..... | 99 |
| 3.1. Der Zelltod der Makrophagen führt zur Aufnahme des bakteriellen Antigens durch dendritische Zellen..... | 99 |
| 3.2 Reifungszustand der dendritischen Zellen nach Aufnahme..... | 101 |
| 3.2.1 Der nekrotische Zelltod könnte die Entwicklung einer antibakteriellen Immunantwort unterstützen..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2 Der Prozess der Aktivierung vor Apoptoseinduktion trägt zur Reifung der dendritischen Zellen bei | 102 |
| V. Zusammenfassung | 104 |
| VI. Literaturverzeichnis | 106 |
| Danksagung | 124 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| APAF | „apoptotic protease activating factor“ |
| ATP | Adenosin 5'-triphosphat |
| BH | Bcl-2-Homologie-Domäne |
| BHA | butyliertes Hydroxyanisol |
| BSA | Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“) |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DC | dendritische Zellen („dendritic cells“) |
| DISC | „death inducing signalling complex“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERK | „extracellular signal-regulated kinase“ |
| FACS | „fluorescence-activated cell sorter“ |
| FCS | fetales Kälberserum („fetal calf serum“) |
| GM-CSF | „granulocyte-macrophage colony stimulating factor“ |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| HMGB1 | „high mobility group 1 protein“ |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase“) |
| HSP | Hitze-Schock-Protein(e) |
| ICAM-3 | „intercellular adhesion molecule 3“ |
| IgG, IgM | Immunglobulin G / M |
| IL | Interleukin |
| JNK | „Jun N-terminal kinase“ |
| LDL | „low density lipoprotein“ |
| LOX-1 | „lectin-like oxidized LDL receptor 1“ |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Molar |
| mA | Milliampère |
| MAP | „mitogen-activated protein“ |
| MBL | Mannose-bindendes-Lektin |
| MFG-E8 | Milch-Fett-Globulin-EGF Faktor 8 |

| | |
|---------------|--|
| MHC I, MHC II | Major-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse I / II |
| Min. | Minute(n) |
| Mio. | Millionen |
| MVA | „modified vaccinia virus Ankara“ |
| NO | Stickoxid („nitric oxide“) |
| OD | optische Dichte |
| OVA | Ovalbumin |
| PAF | Plättchen-aktivierender-Faktor |
| PAMP | “pathogen associated molecular pattern” |
| PARP | Poly-ADP-Ribose-Polymerase |
| PDTC | Pyrrolidindithiocarbamat |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositol-3 Kinasen |
| pH | Maß für den Säuregrad („pondus hydrogenii“) |
| PRR | „pattern recognition receptor“ |
| PS | Phosphatidylserin |
| PSR | Phosphatidylserin-Rezeptor |
| PTX3 | Pentraxin 3 |
| RIP | Rezeptor-interagierendes Protein |
| ROS | „reactive oxygen species“ |
| s | Sekunden |
| SAP | “serum amyloid P-component” |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SLE | Systemischer Lupus erythematoses |
| SP-A, SP-D | Surfactant Protein A / D |
| TAP | “transporter associated with antigen processing” |
| TGF β | „tumor growth factor β “ |
| TLR | Toll-like-Rezeptor(en) |
| TNF | „tumor necrosis factor“ |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |

I. Einleitung

1.1 Apoptose

Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltods: Hierbei werden nicht mehr benötigte oder gefährliche Zellen beseitigt. Dieses „Zell-Suizid“-Programm hat große Bedeutung in der Embryonalentwicklung, für das Immunsystem und in der Erhaltung einer Gewebs- Homöostase in multizellulären Organismen. Apoptose ist gekennzeichnet durch eine charakteristische Morphologie und unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen, die dabei ablaufenden intrazellulären Signalkaskaden und insbesondere Apoptose als Antwort auf eine Infektion mit Bakterien gegeben werden.

1.1.1 Morphologie der Apoptose

Apoptotische Zellen weisen ein einzigartige Morphologie auf (Hacker, 2000): Die sterbende Zelle verliert den Kontakt zu Nachbarzellen und beginnt, Protrusionen der Plasmamembran zu bilden. Dabei kommt es zu einem Verlust von Mikrovilli und Gap junctions auf der Zelloberfläche. Charakteristisch sind die Veränderungen des Kerns: Es kommt zunächst zu einer Aggregation von kondensiertem Chromatin peripher an der Kernmembran, dann schrumpft der Kern und wird in mehrere Teile fragmentiert. Auf molekularer Ebene wird hierbei die DNA in 180-200 Basenpaar-Fragmente zerteilt, die bei Elektrophorese zu dem typischen DNA-Leiterchen-Bild führen (Wyllie, 1987). Die Zelle schrumpft, bis sie schließlich in mehrere kleine apoptotische Körperchen mit jedoch noch intakter umgebender Zellmembran zerfällt. Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi Apparat erscheinen jedoch zumindest in frühen Phasen der Apoptose noch unverändert.

Das sehr ähnliche Muster der morphologischen Veränderungen weist auf die genau regulierten, seit langer Zeit konservierten molekularen Mechanismen der Apoptose hin, die unter Benutzung des gleichen intrazellulären Apparats immer nach denselben Mechanismen abläuft.

1.1.2 Mechanismen der Apoptose

Die nun folgende sehr kurze Darstellung einiger Signaltransduktoren und Regulationsmechanismen der Apoptose soll nur einen kleinen Einblick in die komplexen Abläufe des programmierten Zelltods geben.

Apoptose in Zellen von Säugetieren findet unter der Einwirkung von Caspasen, einer Familie von Cystein-Proteasen, statt. Diese Enzyme weisen eine eindeutige Homologie zu Genprodukten auf, die schon in dem Nematoden *C. elegans* an einem genetisch kontrollierten Zelltodprogramm beteiligt sind (Thornberry and Lazebnik, 1998). Sie werden zunächst als inaktive Zymogene exprimiert. Bei Vertebraten lassen sich Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen unterscheiden. Werden Initiator-Caspasen (wie Caspase 8, 9 und 10), die am Anfang der Signalkaskade stehen, durch Oligomerisation aktiviert, können sie Effektor-Caspasen (wie Caspase 3, 6 und 7) proteolytisch spalten und somit in eine aktive Form überführen (Denault and Salvesen, 2002). Deren Aufgabe ist es nun, eine Reihe von zellulären Substraten zu spalten und somit die charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle einzuleiten.

Es gibt zwei verschiedene Wege, über die Effektorcaspasen aktiviert werden können. Der extrinsische, rezeptorvermittelte Weg wird über eine Bindung von zum Beispiel FasLigand oder TNF an die entsprechenden membranständigen Todesrezeptoren eingeschlagen. Es kommt dabei intrazellulär zu einer Bildung eines Signalkomplexes (genannt DISC, death-induced signalling complex), in den Caspase 8 rekrutiert und dabei aktiviert wird (Budihardjo et al., 1999). Caspase 8 spaltet dann die Effektorcaspase 3.

Der intrinsische, mitochondriale Weg wird in verschiedenen intra- und extrazellulären Stresssituationen aktiviert – so zum Beispiel Hypoxie, Wachstumsfaktor-Entzug oder DNA-Schäden. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Dort bildet es zusammen mit dem Adaptor APAF 1 (apoptotic protease activating factor 1) und Caspase 9 einen Komplex, Apoptosom genannt, in dem Caspase 9 aktiviert wird, die nun die Effektorcaspase 3 spaltet und dadurch aktiviert (Budihardjo et al., 1999). Reguliert werden kann der intrinsische Weg auf der Ebene oberhalb der Mitochondrien durch Proteine aus der Bcl-2-Familie. Hier gibt es sowohl pro- als auch antiapoptotische Mitglieder, die die Freisetzung von Cytochrom c beeinflussen (Cory and Adams, 2002).

1.1.3 Bakterien-induzierte Apoptose

Auch im Rahmen einer Immunantwort bei bakteriellen Infektionen spielt der apoptotische Zelltod eine Rolle. Bakterien werden effektiv von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aufgenommen. Während die meisten Bakterien in diesem Prozess getötet werden, können manche fakultativ intrazelluläre Bakterien wie zum Beispiel *Yersinia*, *Shigella* und *Salmonella* innerhalb der Phagozyten überleben und Apoptose induzieren (Navarre and Zychlinsky, 2000): Für die Auslösung von Apoptose in Makrophagen durch *Yersinia* sind dabei sezernierte Virulenzfaktoren notwendig (Monack et al., 1997), *Shigella* induziert Apoptose in Makrophagen durch Sekretion von bakteriellen Faktoren in das Zytosol (Chen et al., 1996). Doch auch Bakterien wie *Staphylococci*, *Streptococci* und *Escherichia coli*, die nicht derartige Virulenzfaktoren besitzen, können wohl Apoptose auslösen. Diese kommensalen Bakterien, die opportunistische Infektionen verursachen können, besitzen zwar nicht die Eigenschaft, nach Phagozytose weiterleben zu können, dennoch führt deren Aufnahme in einigen Fällen zum Tod der Phagozyten. So wurde zum Beispiel nach Ingestion von *E.coli*-Bakterien in menschlichen neutrophilen Granulozyten Apoptose induziert (Watson et al., 1996). In anderen Studien zeigte sich zwar in primären menschlichen Makrophagen nach Phagozytose von Bakterien eine erhöhte Apoptoserate, humane neutrophile Granulozyten wiesen dagegen sogar eine verlängerte Lebensdauer auf (Baran et al., 1996).

In unserer Laborgruppe konnte nachgewiesen werden, dass RAW 264.7 Maus-Makrophagen effizient *E.coli*-Bakterien aufnehmen und verdauen, im Anschluss an diesen Prozess jedoch Caspase 9- und Caspase 3- abhängige Apoptose zeigen (Hacker et al., 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wird der Zelltod in Phagozyten nach Aufnahme von *E.coli* Bakterien näher betrachtet. Neben der Apoptose gibt es noch eine andere Form des Zelltodes, die auch in (patho-)physiologischen Situationen immer mehr Aufmerksamkeit auf sich zieht: Die Nekrose.

1.2 Nekrose

Im Gegensatz zu dem seit langem konservierten, fein regulierten Prozess der Apoptose, galt Nekrose lange Zeit als unregulierter passiver Ablauf einer traumatischen Zelldestruktion. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die

Regulationsmechanismen auf molekularer Ebene komplexer sind, als bisher angenommen. Nekrotische Zellen unterscheiden sich in ihrer Morphologie, den intrazellulären Abläufen und den Konsequenzen für den Organismus eindeutig von apoptotischen Zellen.

1.2.1 Morphologie nekrotischer Zellen

Der nekrotische Zelltod ist gekennzeichnet durch ein Anschwellen der Zellen samt ihrer Kerne. Dabei verliert die Zelle nicht nur die Integrität der Plasmamembran, auch ihre Organellen erfahren biochemische Veränderungen: Permeabilisation beziehungsweise Ruptur von Membranen lassen sich auch hier finden (Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Lysosomen scheinen dabei eine essentielle Rolle in der Kontrolle des nekrotischen Zelltods zu spielen (Ferri and Kroemer, 2001). Lysosomen, die mehr als 80 Typen hydrolytischer Enzyme besitzen, setzen diese während nekrotischem Zelltod (etwa bei Ischämie in Herz und Gehirn) ins Zytoplasma frei (Adamec et al., 2000). Aufgrund der Zerstörung der Plasmamembran gelangen derartige intrazelluläre Bestandteile auch ins extrazelluläre Milieu und können einen Entzündungsstimulus darstellen (Guimaraes et al., 2004).

Eine Kondensation und gezielte Fragmentation des Kerns, wie sie bei apoptotischem Zelltod beobachtet werden kann, findet sich in der Nekrose nicht. Wie die Zelle schwillt hier auch der Kern an; nukleäre DNA wird degradiert, dabei sind jedoch wahrscheinlich andere DNAsen als in der Apoptose beteiligt (Tsukada et al., 2001). Auf morphologischer Ebene kann somit der nekrotische Zelltod deutlich von der Apoptose abgegrenzt werden.

1.2.2 Nekrose-Stimuli

Schon längere Zeit ist bekannt, dass eine schwerwiegende Veränderung der physiologischen Konditionen zu nekrotischem Zelltod führt. Dazu zählen extreme Temperaturänderungen, Hypoxie und Ischämie, Hypoglykämie, Exposition gegenüber Giften oder reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Nahrungsentzug (Nicotera et al., 1999; Walker et al., 1988). In diesem Zusammenhang wurde die Nekrose oft als unregulierte, passive Form des Zelltods mit schneller Disruption der

Plasmamembran und Freisetzung intrazellulärer Bestandteile angesehen. In den letzten Jahren gibt es jedoch immer mehr Hinweise, dass der nekrotische Zelltod ein regulierter Prozess ist, der durch verschiedene physiologische und pathologische Stimuli aktiviert werden kann.

So konnte beobachtet werden, dass einige Bakterien und Viren in den infizierten Zellen Nekrose induzieren können. Dazu zählen die Bakterienspezies *Shigella flexneri* (Francois et al., 2000), *Salmonella typhi* (Boise and Collins, 2001) und *Mycobacterium avium* (Ehlers et al., 1999) sowie das HI-Virus (Borthwick et al., 1999; Plymale et al., 1999). Manche bakterielle Toxine (Dong et al., 1997; Warny et al., 2000) und Bestandteile der Immunabwehr wie Komplement (Shimizu et al., 2000) oder aktivierte natürliche Killerzellen (Blom et al., 1999) scheinen auszureichen, um Nekrose zu induzieren. Auch spielt wohl in einigen neurodegenerativen Syndromen und Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Huntington, Morbus Parkinson, amyotropher Lateralsklerose und Epilepsie der nekrotische Zelltod eine Rolle (Price et al., 1998).

Doch tritt Nekrose nicht nur während pathologischer Ereignisse, sondern auch in physiologischen Prozessen auf. Während der normalen Zellerneuerung im Dünndarm trägt wohl Apoptose und Nekrose zum Zellverlust bei (Mayhew et al., 1999), und auch im Dickdarm können unter physiologischen Bedingungen in Krypten isolierte nekrotische Zellen gefunden werden (Barkla and Gibson, 1999). Zusammen mit Apoptose tritt Nekrose auch in der Follikelreifung während der Oogenese auf (Murdoch, 1999).

Das Auftreten von Nekrose in diversen physiologischen und pathophysiologischen Situationen unterstreicht die Bedeutung dieser Form des Zelltods.

1.2.3 Mechanismus der Nekrose

Die molekularen Abläufe, die während zellulärer Nekrose stattfinden, sind noch bei weitem nicht aufgeklärt. Dennoch konnten einige Rezeptoren, Botenstoffe und Exekutoren identifiziert werden, die in den Prozess der Nekrose integriert zu sein scheinen.

1.2.3.1 Extrazelluläre Mediatoren, Liganden und Rezeptoren

Von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie ist bekannt, dass sie Apoptose initiieren können. Jetzt konnte gezeigt werden, dass sowohl Fas und TRAIL (Holler et al., 2000; Vercammen et al., 1998b) als auch TNF (Boone et al., 2000; Denecker et al., 2001; Vercammen et al., 1997) auch Nekrose verursachen können. Für den Signaltransduktionsweg dieses Caspasen-unabhängigen Zelltods in aktivierten primären T-Zellen wird das Rezeptor-interagierende Protein RIP benötigt (Holler et al., 2000).

Zu den Rezeptoren, die im Prozess der Nekrose eine Rolle spielen, zählt außerdem der Glutamaterezeptor. Abhängig vom Zelltyp und verschiedenen Rezeptoruntertypen sterben die Zellen nach Rezeptoraktivierung entweder durch Apoptose oder durch Nekrose (Nicotera and Lipton, 1999). Durch exogenes ATP oder auch Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* werden purinerge Rezeptoren wie der P2Z-Rezeptor erregt, und Nekrose wird induziert (Schulze-Lohoff et al., 1998; Zaborina et al., 2000). Viele der Rezeptoren können sowohl Apoptose als auch Nekrose einleiten. Die Wahl des einen oder anderen Programms ist dabei wahrscheinlich abhängig vom Typ und der Intensität des Stimulus und der zellulären biochemischen Situation (Proskuryakov et al., 2003).

1.2.3.2 Ionen und Lipide

Kalzium-Ionen gehören zu den einflussreichsten Mediatoren des Zelltods. In Versuchen von Yoshioka et al. konnten durch Entfernung von Kalzium aus dem Medium die Zellen vor Nekrose durch Anoxie geschützt werden (Yoshioka et al., 2000). Durch oxidiertes LDL induzierte Nekrose kann durch Kalzium-Chelatoren inhibiert werden (Meilhac et al., 1999; Tashiro et al., 1999). Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration durch eine Ionenkanalmutation in *C. elegans* kann nekrotischen Zelltod initiieren (Xu et al., 2001). Ob die Kalzium-Konzentration auch in anderen Fällen Einfluss auf den Zelltod durch Nekrose hat, muss noch geklärt werden.

1.2.3.3 PARP

Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym, das nach massiven DNA-Brüchen aktiviert wird und durch Verbrauch von ATP für das Substrat NAD⁺ zu

Nekrose führen kann (Eliasson et al., 1997). Im Prozess der Apoptose dagegen wird PARP normalerweise durch Caspasen inaktiviert. Eine Inhibition der PARP-Aktivität reduziert den nekrotischen und erhöht den apoptotischen Zelltod (Kim et al., 2000).

1.2.3.4 Redox-Signale

Im Rahmen der Immunabwehr oder anderen Stresssituationen kommt es zum Beispiel in Makrophagen zu einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species). Fallen die antioxidativen Abwehrsysteme aus, führen diese stark toxischen Substanzen zum Zelltod: Sowohl Apoptose als auch Nekrose wird durch Hydrogen Peroxid induziert (Hampton and Orrenius, 1997; Palomba et al., 1999), verhindert werden kann dies in einigen Fällen durch Antioxidantien wie Gluthathion oder N-Acetyl-Cystein (Blanco et al., 1995). In anderen Versuchen wurde apoptotischer Zelltod nach Cadmium-, Cisplatin- und Melphalan-Behandlung durch Inhibierung der Gluthathion-Synthese in Nekrose umgewandelt (Galan et al., 2000; Troyano et al., 2001). Neben ROS ist Stickoxid (NO) ein häufiger Mediator pathophysiologischer Prozesse. NO kann Apoptose durch Nitrosylierung von Caspase 3 inhibieren (Mannick et al., 1999) und statt zu Apoptose bei Behandlung mit Staurosporin, Ceramid, FAS und Retinoiden zu Nekrose führen (Leist et al., 1999; Melino et al., 2000).

1.2.3.5 Proteinkinasen

Einige Proteinkinasen, die beim apoptotischen Zelltod eine Rolle spielen, scheinen auch am Prozess der Nekrose beteiligt zu sein. So führt eine Inhibition der Jun N-terminalen Kinase (JNK) aus der MAP-Kinasen-Familie (Gabai et al., 2000) und auch der verwandten Stresskinase p38 (Ma et al., 1999; Sugino et al., 2000) in manchen Fällen zu einer Verminderung des nekrotischen Zelltods. Andererseits konnte durch Aktivierung der AKT-Kinase und der MAP-Kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase), die Zellen vor Stress-induzierter Apoptose beschützen, auch nekrotischer Zelltod verringert werden (Mochizuki et al., 2002; Punn et al., 2000; Yue et al., 2000). Diese Versuche legen die Vermutung nahe, dass in einigen Fällen Kinasen mit zum Teil proapoptotischer (JNK, p38) und antiapoptotischer (AKT, ERK) Wirkung eine ähnliche Rolle in der Nekrose spielen.

1.2.3.6 Proteine der Bcl-2-Familie

Auch Proteine der Bcl-2-Familie scheinen nicht nur den Zelltod durch Apoptose, sondern auch den durch Nekrose zu beeinflussen. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 und Bcl-X_L nicht nur Apoptose, sondern auch Nekrose inhibieren (Brocheriou et al., 2000; Saldeen, 2000; Single et al., 2001). Es ist jedoch anzumerken, dass der nekrotische Zelltod nicht in allen Fällen durch Proteine der Bcl-2-Familie supprimierbar ist (Phillips et al., 2000; Virag and Szabo, 2000). Der Mechanismus des teilweise antinekrotischen Effekts von Bcl-2 und Bcl-X_L ist nicht genau bekannt, vermutet wird aber eine Beteiligung an der Erhaltung der mitochondrialen Integrität (Proskuryakov et al., 2003).

1.2.3.7 Hitze-Schock-Proteine

Auch Hitze-Schock-Proteine (HSP) können nicht nur Apoptose inhibieren (Jaattela, 1999), sondern auch Zellen vor Nekrose beschützen, die durch oxidativen Stress (Simon et al., 1995), NO (Bellmann et al., 1996) oder Ischämie / Reperfusion (Plumier et al., 1995) ausgelöst wurde. Wie genau dieser Schutz vor Nekrose stattfindet, ist noch unklar, es gibt jedoch Hinweise dafür, dass Hitze-Schock-Proteine die mitochondriale Funktion zu erhalten helfen (Burkart et al., 2000) – wahrscheinlich nicht direkt, sondern über eine Reduzierung der Aktivität von JNK und p38 (Gabai et al., 2000). Doch es gibt auch gegenteilige Beobachtungen: Durch den HSP-90 Inhibitor Geldanamycin können Jurkat-Zellen eine Resistenz gegenüber Caspasen-unabhängigem, durch FasL induzierten Zelltod erlangen. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine assoziierte Degradation von RIP (Holler et al., 2000).

1.2.3.8 Mitochondrien

Mitochondrien nehmen somit eine Schlüsselstellung in der Entscheidung über das Schicksal einer Zelle ein. Sie setzen nicht nur den bei der Apoptose wichtigen Faktor Cytochrom c frei, sondern stellen auch die wichtigste Quelle von ATP dar. Ein bestimmter Spiegel von ATP ist notwendig für den Ablauf apoptotischer Signaltransduktionswege, so ist es als Kofaktor wichtig bei der Apoptosombildung

(Genini et al., 2000). Fällt die ATP-Menge unter einen kritischen Spiegel, kann dies apoptotischen Zelltod in nekrotischen umwandeln oder spontan Nekrose induzieren; auf manche Zellen hat die ATP-Depletion keinen Einfluss (Übersicht in Kabakov and Gabai, 1994). Neben ATP werden auch Sauerstoffradikale aus Mitochondrien freigesetzt, was zur Initiation des Nekrose-Programms führen kann (siehe oben).

1.2.3.9 Proteasen

Im Exekutionsprogramm der Nekrose erfolgt schließlich eine Aktivierung von Proteasen. Zu diesen Proteasen gehört Calpain, das durch erhöhte Kalzium-Konzentrationen aktiviert wird und unter anderem zu einer Ruptur von Lysosomen führt (Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Inhibition von Calpain unterdrückt Ca^{2+} -induzierte Nekrose von Neuronen (Lankiewicz et al., 2000; Zhao et al., 1999). Eine Cystein Protease, die zum Beispiel nach Calpain-Aktivierung aus Lysosomen freigesetzt wird, ist das Cathepsin B. Es scheint eine Rolle bei dem TNF-induzierten Zelltod in Hepatozyten nach Ischämie und Reperfusion zu spielen (Kohli et al., 1999).

Auch wenn bereits ein Teil der doch sehr komplexen Mechanismen und Regulationsmöglichkeiten der Nekrose beschrieben werden konnte, müssen sicherlich noch genauere Einsichten in das „Programm“ der Nekrose gewonnen werden. In dieser Arbeit wird der nekrotische Zelltod in Phagozyten nach Aufnahme von *E.coli* Bakterien genauer charakterisiert, dabei werden Einsichten in den Prozess der Bakterien-induzierten Nekrose gewonnen.

2. Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen

Während der Embryonalentwicklung oder im Rahmen der normalen Zellerneuerung der verschiedenen Gewebe fällt eine große Anzahl an Zellen an, die vom Körper sehr effizient entfernt werden. Eine komplette Erneuerung aller im Blut zirkulierenden Neutrophilen erfolgt zum Beispiel zweieinhalb mal pro Tag (Wintrobe, 1983). Es ist dabei wichtig, dass eine effektive Aufnahme von apoptotischen Zellen stattfindet, bevor die sterbenden Zellen lysieren oder sekundärer Nekrose unterliegen. Dies hat zur Folge, dass möglicherweise inflammatorisch wirkende Bestandteile aus dem Inneren der Zellen nicht freigesetzt werden (siehe Punkt 3.2.2).

2.1 Mechanismen der Phagozytose

Der genaue Mechanismus der Aufnahme toter, vor allem apoptotischer Zellen ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine große Anzahl von möglichen Signalen auf apoptotischen Zellen und Rezeptoren auf Phagozyten, die zumindest *in vitro* eine Rolle spielen, ist bereits identifiziert worden. Hier sollen zwei Aufnahmemechanismen genauer betrachtet werden: Die Beteiligung einer Phosphatidylserin-Expression und einer Opsonisierung mit Kollektinen an der Aufnahme sterbender Zellen. Interessant erscheint ein derartiger Vergleich, weil diese beiden Wege der Aufnahme möglicherweise verschiedene Konsequenzen für die Entwicklung oder Unterdrückung einer potentiellen Immunantwort haben.

2.1.1 Externalisation von Phosphatidylserin und Aufnahme durch den Phosphatidylserinrezeptor: ein nicht-immunogener Prozess?

Wie können Phagozyten apoptotische von intakten Zellen unterscheiden? Eine wichtige Veränderung, die im Rahmen des programmierten Zelltodes zu einem frühen Zeitpunkt auftritt, ist ein Verlust der Asymmetrie der Phospholipidverteilung in der Plasmamembran. Einige Phospholipide wie Phosphatidylserin (PS) und zum Teil auch Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin befinden sich in lebenden Zellen vor allem auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Plasmamembran-Doppelschicht (Fadok et al., 1998). Diese Asymmetrie wird durch zwei verschiedene Mechanismen aufrechterhalten: Zum einen scheint eine Aminophospholipid-Translokase zu existieren (Bever et al., 1999; Daleke and Lyles, 2000; Fadok et al., 2001b), eine Magnesium-abhängige ATPase. Diese Translokase transportiert Phosphatidylserin, das die Außenseite der Plasmamembran erreicht hat, zurück nach innen. Zusätzlich konnte ein nicht-lipid-spezifische „Phospholipid-Skramblease“ identifiziert werden. Durch sie werden Phospholipide in beiden Richtungen über die Membran transportiert, was die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin erhöht (Sims and Wiedmer, 2001). Im Prozess der Apoptose nun findet eine Aktivitätsänderung dieser Transporter statt: Die Aminophospholipid-Translokase wird – wahrscheinlich zum Teil durch eine erhöhte intrazelluläre Calcium- und verminderte ATP-Konzentration (Bratton et al., 1997; Verhoven et al., 1999) – inaktiviert. Die

Skramblase dagegen erfährt eine Aktivierung: Dies geschieht wohl nach einer Spaltung und gleichzeitigen Aktivierung der ProteinKinase C δ durch Caspase 3 (Frasch et al., 2000), aber auch die intrazelluläre Calcium-Konzentration mag hier wieder eine Rolle spielen (Sims and Wiedmer, 2001). Für ein effizientes Funktionieren der Phospholipid Skramblase scheint noch weitere Hilfe nötig zu sein. Diese wird durch ABC1 Transporter bereitgestellt. Eine Zerstörung der Gene für diese Transporter bewirkt nicht nur ein vermindertes Ausmaß an Phosphatidylserin-Exposition während Apoptose (Hamon et al., 2000; Marguet et al., 1999) sondern behindert auch die Aufnahme der so modifizierten apoptotischen Zellen durch Phagozyten (Wu and Horvitz, 1998).

Zahlreiche Zelloberflächen- oder überbrückende Moleküle können an exponiertes Phosphatidylserin binden: Dazu zählen unter anderem die Rezeptoren CD36 (Ren et al., 1995), CD68 (Sambrano and Steinberg, 1995), CD14 (Devitt et al., 1998) und LOX-1 (Oka et al., 1998). Den bedeutendsten und weitverbreitesten Bindungspartner stellt jedoch wohl der Phosphatidylserin-Rezeptor (PSR) dar. Dieser Rezeptor wird von allen Zellen exprimiert, die die Fähigkeit besitzen, apoptotische Zellen aufzunehmen: Makrophagen, dendritische Zellen (Fadok et al., 2001b), Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (Fadok et al., 2000). Wenn er in Lymphozyten, die diesen Rezeptor normalerweise nicht besitzen, exprimiert wird, erlangen diese dadurch die Fähigkeit, apoptotische Zellen aufzunehmen. Weiterhin finden sich Homologe in *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* (Fadok et al., 2000). Die Bedeutung dieses Rezeptors und seines Liganden wird in Versuchen deutlich, in denen durch Blockierung der PS-Expression oder des PSR die Aufnahme apoptotischer Zellen fast vollständig behindert werden konnte (Fadok et al., 2000; Fadok et al., 2001c; Krahlung et al., 1999). Mäuse, die keine Phosphatidylserinrezeptoren exprimieren, häufen apoptotische Zellen zum Beispiel in der Lunge und im Gehirn an, was zu abnormer Entwicklung dieser Organe und neonataler Letalität führt (Li et al., 2003).

Diese Ergebnisse müssen jedoch kritisch betrachtet werden: In Versuchen von Böse et al. konnte eine Beteiligung des als PS-Rezeptor identifizierten Gens an der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen nicht bestätigt werden. Diese Arbeitsgruppe beobachtete, dass das Gen jedoch wichtig für die Regulation der Zytokinproduktion in Makrophagen ist und es bei Ausschaltung des

Gens zu einer Störung der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organe während der Embryonalentwicklung kommt (Bose et al., 2004). Eine endgültige Klärung dieses Sachverhalts steht noch aus.

Doch welche Auswirkung hat die Präsenz von Phosphatidylserin auf das Immunsystem? In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es bei Kontakt zu Phosphatidylserin präsentierenden Zellen zu einer Gegenregulation einer Entzündungsreaktion kommt. So führte der Kontakt von Makrophagen mit apoptotischen, PS exprimierenden Zellen oder Liposomen, die PS enthielten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer vermehrten Sekretion des antiinflammatorisch wirksamen TGF β und zu einer Suppression der TNF Produktion nach Stimulation durch LPS (Fadok et al., 2000; Huynh et al., 2002). Neben der Unterdrückung einer Immunantwort durch TGF β scheinen auch andere antiinflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E2 und Interleukin 10 hier eine Rolle zu spielen (Fadok et al., 2001a; Fadok et al., 1998). Auch bei dendritischen Zellen gibt es Hinweise darauf, dass PSR-Ligation eine Suppression der Reifung und Antigenpräsentation bewirkt (Henson et al., 2001). Schließlich konnte auch *in vivo* eine Erhöhung der Immunogenität apoptotischer T-Zellen durch Blockierung von Phosphatidylserin durch Annexin V beobachtet werden (Stach et al., 2000).

Eine Exposition von Phosphatidylserin spielt somit wahrscheinlich nicht nur in der Aufnahme apoptotischer Zellen sondern auch in der Blockierung einer Entzündung und einer konsekutiven Immunantwort eine herausragende Rolle.

2.1.2 Beteiligung von Kollektinen und Komplement an der Oponisierung und Aufnahme toter Zellen – ein immunogener Prozess?

Zu den Prozessen, die sich auf der Oberfläche apoptotischer Zellen abspielen, gehören auch die Veränderungen von Membran-Carbohydraten wie eine erhöhte Expression von Fucose und N-acetyl-glycosamin (Nauta et al., 2003a). Die Beteiligung von Carbohydrat-bindenden Lektinen an der Aufnahme apoptotischer Zellen wurde schon länger vermutet (Duvall et al., 1985), in aktuellen Studien konnte nun eine derartige Mitwirkung sowohl der Kollektine Mannose-bindendes-Lektin (MBL), Surfactant Protein A (SP-A) und D (SP-D) als auch des Kollektin-ähnlichen Komplementbestandteils C1q nachgewiesen werden (Nauta et al., 2003a; Nauta et al., 2002; Ogden et al., 2001; Schagat et al., 2001).

Über den genauen Bindungsmechanismus an die apoptotischen Zellen herrscht noch keine Klarheit, es scheint jedoch eindeutige Unterschiede zu geben: Während MBL über seine Lektin-Domäne an apoptotische Zellen gekoppelt wird (Nauta et al., 2003b), bindet SP-A wohl unabhängig von der Lektin-Domäne (Schagat et al., 2001). C1q kann sowohl direkt als auch über verschiedene Intermediate wie zum Beispiel zellgebundenes IgG und IgM an apoptotische Zellen gekoppelt werden (Übersicht in Roos et al., 2004).

Auf Seite der Phagozyten haben SP-A, SP-D und C1q jedoch wahrscheinlich einen gemeinsamen Bindungspartner: Der α 2-Makroglobulin-Rezeptor CD91, der sich auf der Oberfläche von Phagozyten wie Makrophagen und dendritischen Zellen befindet (Basu et al., 2000).

Zu diesem Zeitpunkt taucht wieder die Frage auf, was für eine Konsequenz eine Aufnahme apoptotischer Zellen über diesen Mechanismus für die Phagozyten hat. Relevant erscheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass CD91 auch einen Rezeptor für Hitze-Schock-Proteine (im Besonderen HSPgp96, HSP90 und HSP70) darstellt (Basu et al., 2001; Binder et al., 2000). Diese Proteine befinden sich intrazellulär, werden unter bestimmten Umständen aus sterbenden Zellen freigesetzt und stellen einen starken Entzündungsstimulus für aufnehmende dendritische Zellen dar (Basu et al., 2000). Einen weiteren Hinweis darauf, dass eine Beteiligung des CD91-Rezeptors eher für eine immunstimulatorische Reaktion spricht, liefert die Beobachtung, dass die Bindung von C1q und MBL an sterbende Zellen (im Gegensatz zur Ligation des PSR) wohl eher zu einem späteren Zeitpunkt im Prozess der Apoptose stattfindet: Die Bindungsaffinität von C1q ist zu spät-apoptotischen Zellen viel stärker als zu früh-apoptotischen (Nauta et al., 2002), MBL wird sogar nur an Zellen mit fortgeschrittenen Apoptose-Zeichen gekoppelt (Nauta et al., 2003b). Zu diesem Zeitpunkt kann eine Integrität der Plasmamembran nicht mehr garantiert werden. Außerdem binden beide Moleküle auch an nekrotische Zellen (Nauta et al., 2003b; Roos et al., 2004), die allgemein eher als Initiatoren einer Entzündungsreaktion angesehen werden (siehe Punkt 3.2.2).

Dennoch gibt es auch gegenteilige Beobachtungen. Zwar erwies sich die Interaktion von SP-A und C1q mit CD91 als proinflammatorisch (Gardai et al., 2003), apoptotische Zellen opsoniert mit CRP und Komplement führten jedoch zu einer vermehrten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins TGF β in Makrophagen

(Gershov et al., 2000). Eine eindeutige Klärung der Bedeutung einer CD91-Ligation für die Initiation einer Immunantwort steht somit noch aus.

2.1.3 Weitere Liganden und Rezeptoren für die Aufnahme apoptotischer Zellen

Eine Reihe von weiteren Rezeptoren und Liganden scheinen an der Aufnahme apoptotischer und nekrotischer Zellen beteiligt zu sein. Zu diesen zählen Integrinrezeptoren wie der $\alpha\beta 5$ -Rezeptor auf dendritischen Zellen (Albert et al., 2000; Albert et al., 1998b) und der $\alpha\beta 3$ Vitronectin-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen, der zusammen mit CD36 über Thrombospondin als Brückenmolekül an apoptotische Zellen bindet (Savill and Fadok, 2000). Neben Thrombospondin kann auch der Wachstumsfaktor MFG-E8 den $\alpha\beta 3$ -Rezeptor mit apoptotischen Zellen verbinden, der Bindungspartner auf der Seite der toten Zelle scheint Phosphatidylserin zu sein (Hanayama et al., 2002; Miyasaka et al., 2004). Weitere Brückenmoleküle zwischen Phagozyt und Zielzelle stellen vermutlich das Glykoprotein $\beta 2$ GP1 (Balasubramanian et al., 1997) und das Produkt des Wachstums-Arrest-spezifischen Gens 6 (gas6), das vermutlich an die Rezeptor Tyrosinkinase MER bindet (Ishimoto et al., 2000; Nakano et al., 1997), dar. Ähnlich wie Komplementbestandteile könne auch die Pentraxine SAP, CRP und PTX3 an apoptotische Zellen binden und Impulse zur Aufnahme dieser Zellen geben (Nauta et al., 2003a). Weitere Rezeptoren auf Seite der Phagozyten, die vermutlich zur Erkennung apoptotischer Zellen beitragen, sind Scavenger Rezeptoren der Klasse A und B, Rezeptoren für oxidiertes LDL wie CD68 und LOX-1 und der Endotoxin-Rezeptor CD14, der unter anderem veränderte ICAM-3-Domänen auf apoptotischen Zellen erkennt (Fadok et al., 2001b).

Die Liste dieser in die Aufnahme toter Zellen verwickelter Moleküle ist sicherlich unvollständig, Ergebnisse in diesem Gebiet führen in immer neue Richtungen und weisen auf ein komplexes Netzwerk mit zahlreichen Bestandteilen hin. Die Frage, welche Rezeptoren und Liganden für eine *in vivo* Beseitigung apoptotischer Zellen wirklich notwendig sind, darf deshalb nicht aus den Augen verloren werden.

2.2 Bedeutung der Aufnahme toter Zellen durch professionelle Phagozyten

Die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten dient nicht nur dazu, sie einfach aus den verschiedenen Geweben zu entfernen. Die professionellen Phagozyten besitzen mehr als nur eine derartige „Reinigungsfunktion“:

Zum einen soll durch eine frühe Aufnahme apoptotischer Zellen verhindert werden, dass intrazelluläres Material (zum Beispiel durch sekundäre Nekrose, siehe Nauta et al., 2003a) unkontrolliert freigesetzt wird. Derartige Faktoren könnten eine Entzündungsreaktion unterhalten (siehe Punkt 3.2.2), die im Rahmen der normalen Zellerneuerung in den verschiedenen Geweben unerwünscht ist. Wird durch Anwendung eines anti-Fas-Antikörpers in Mäusen massiv Apoptose induziert und die Kapazität zur Beseitigung dieser Zellen vermutlich dadurch überschritten, resultiert dies in einer Freisetzung inflammatorischer und toxischer Inhalte, die zu schwerwiegenden Gewebsschäden führen (Ogasawara et al., 1993).

Viele Autoren nehmen an, dass apoptotische Zellen eine Quelle von Autoantigenen und somit Verursacher von Autoimmunkrankheiten darstellen. Durch aktive Spaltung von Proteinen könnten dabei in apoptotischen Zellen Neo-Autoantigene entstehen (Casciola Rosen et al., 1995; Casciola-Rosen et al., 1994; Casiano et al., 1996). Gestützt wird diese These durch Beobachtungen, dass Menschen, die den Komplementbestandteil C1q, der wichtig für die Aufnahme apoptotischer Zellen ist (siehe Punkt 2.1.2), nicht exprimieren können, zu 95% die Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus erythematodes (SLE) entwickeln (Bowness et al., 1994). C1q-defiziente Mäuse weisen multiple apoptotische Körperchen in der Niere auf und entwickeln sowohl Autoantikörper als auch eine Nierenfunktionsstörung, die der einer SLE-Erkrankung ähnelt (Botto et al., 1998). Weiterhin wurde beobachtet, dass Mäuse, die mit einer großen Zahl von apoptotischen Thymozyten immunisiert wurden, mit der Produktion von Autoantikörpern begannen (Mevorach et al., 1998). Eine schnelle und effiziente Beseitigung apoptotischer Zellen trägt somit wahrscheinlich zur Vermeidung einer Entstehung von Autoimmunkrankheiten bei.

In unserem Modell könnte eine derartig schnelle Aufnahme jedoch noch einen weiteren Effekt haben. So könnte Antigen, das sich in den toten, aufzunehmenden Zellen befindet, unter bestimmten Umständen dazu verwendet werden, eine spezifische Immunantwort gegen dieses Antigen zu induzieren. Dies wäre sogar ein erwünschter Effekt, wenn es sich, wie in unserem Fall, um bakterielle Antigene handelt, die assoziiert sind mit Zelltod in den primär aufnehmenden Phagozyten. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, den Blick auf einen Zelltyp zu wenden, der

sowohl tote Zellen effektiv aufnehmen als auch in der Funktion als antigenpräsentierende Zelle eine Immunantwort induzieren kann: Dendritische Zellen (DC).

3. Dendritische Zellen – Schlüsselstellen in der Entwicklung einer Immunantwort

Dendritische Zellen haben die Fähigkeit, sowohl B- als auch T-Lymphozyten im Rahmen einer Immunantwort zu stimulieren. Während B-Zellen mit Hilfe ihrer B-Zell-Rezeptoren Antigene direkt erkennen können, sind T-Zellen auf eine Prozessierung und Präsentation dieser Antigene durch antigenpräsentierende Zellen, zu denen die dendritischen Zellen gehören, angewiesen. Eine derartige Präsentation erfolgt auf Peptid-bindenden Proteinen auf der Oberfläche der Zellen: Major-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) der Klasse I und II.

Hier werden Antigene unterschiedlicher Herkunft präsentiert: Auf MHC der Klasse II erscheinen dabei extrazelluläre Antigene, die – meist über den Prozess der Endozytose – Zugang ins Innere der antigenpräsentierenden Zellen bekommen haben. Erkannt werden diese MHC II – Peptid – Komplexe von T-Helfer-Zellen (CD4-T-Zellen), die eher immunregulatorische Aufgaben haben. Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8-T-Zellen) dagegen, die Effektoren des Immunsystems darstellen und Zielzellen aktiv lysieren, besitzen Rezeptoren, die Peptide in Verbindung mit MHC der Klasse I erkennen können. Es sind zwei Mechanismen beschrieben, wie dendritische Zellen Antigen in diesen Präsentationsweg einschleusen können: Zum einen binden intrazelluläre Antigene nach zytosolischer Prozessierung an MHC der Klasse I. Dies gilt sowohl für primär zytosolische Antigene als auch für Genmaterial, das durch Virusinfektion oder Transfektion mit DNA in den Zellen exprimiert wird (Heath et al., 2004). Dies stellt die „klassische“, direkte Methode der MHC I – Präsentation dar. Dendritische Zellen besitzen jedoch die Fähigkeit, auch exogene Antigene nach Internalisation und Aufbereitung auf MHC I an ihrer Oberfläche zu verankern. Diese Form der Antigenpräsentation wird als Kreuz-Präsentation bezeichnet.

3.1 Dendritische Zellen und ihre Fähigkeit zur Kreuz-Präsentation

3.1.1 Aufnahme von Antigenen zur Kreuz-Präsentation

Dendritische Zellen, die sich in peripheren Geweben aufhalten, besitzen eine hohe Potenz, exogene Antigene aufzunehmen. Diese Internalisierung kann über verschiedene Prozesse geschehen und hängt von der Beschaffenheit des Antigens ab (Brode and Macary, 2004): So wird lösliches Antigen auf dem Weg der Pinozytose zusammen mit extrazellulärer Flüssigkeit in neugebildete Endosomen aufgenommen. In dem Mechanismus der Endozytose werden nach Invagination der Plasmamembran Vesikel von einer Größe von 150-200 nm gebildet. Kleine partikuläre Antigene induzieren diesen Prozess über eine Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren (Mellman, 1996). Über den Weg der Phagozytose schließlich können große Partikel wie apoptotische und nekrotische Zellen oder Bakterien internalisiert werden. Dies geschieht in 3 Stufen: Die Partikel werden über Oberflächenrezeptoren (siehe Punkt 2.1) an die Phagozyten gebunden, durch Invagination der Plasmamembran aufgenommen und in den so gebildeten Phagosomen weiterverarbeitet. In in vitro Untersuchungen gibt es Hinweise dafür, dass auch über die Aufnahme von antigenpräsentierenden Vesikeln, genannt Exosomen (Zitvogel et al., 1998), oder über den Transfer von Hitze-Schock-Proteinen (Srivastava, 2002) Antigene zur Kreuz-Präsentation eingeschleust werden. Sogar lebendes zelluläres Material soll zwischen anderen Zellen und dendritischen Zellen zur Kreuz-Präsentation transferiert werden können (Harshyne et al., 2001; Harshyne et al., 2003).

Auf diese verschiedenen Art und Weisen können dendritische Zellen sowohl Immunkomplexe (den Haan and Bevan, 2002) und lösliche Proteine (Pooley et al., 2001) als auch zelluläre Antigene (Ramirez and Sigal, 2002) samt intrazellulären Bakterien (Pfeifer et al., 1993) und Parasiten (Belkaid et al., 2002) aufnehmen und nach Prozessierung kreuz-präsentieren.

3.1.2 Mechanismus der Kreuz-Präsentation

Der genaue Mechanismus der Kreuz-Präsentation ist Gegenstand aktueller Forschung. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fusion von Phagosomen samt aufgenommenes Antigenmaterial mit Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) den Beginn dieses alternativen Präsentationsweges darstellt

(Guermonez et al., 2003; Houde et al., 2003). Diese neugebildeten Kompartimente enthalten sowohl MHC Klasse I Moleküle als auch sämtliche Instrumente, die zur Beladung dieser Oberflächenmoleküle notwendig sind: Transporter, die mit Antigenpräsentation assoziiert sind (TAP), Tapasin, Calreticulin und Erp57 (Cresswell et al., 1999). Von hier aus gelangen die phagozytierten Antigene auf bisher nicht genau bekannte Weise ins Zytosol (Heath et al., 2004), wo sie im zellulären Proteasom degradiert werden. Die Bedeutung des Antigenabbaus im Proteasom unterstreichen Experimente, in denen die Kreuz-Präsentation durch Blockierung der proteasomalen Degradierung mit Hilfe von Lactacystin verhindert werden konnte (Rodriguez et al., 1999). Die resultierenden Peptide werden über den TAP-Komplex zurück ins ER-Phagosom transportiert und an MHC Klasse I gebunden. Bei Versuchen mit TAP-defizienten Mäusen (den Haan et al., 2000) oder Blockierung des TAP-Komplexes durch Antikörper (Ackerman and Cresswell, 2003) konnte keine effektive Kreuz-Präsentation mehr beobachtet werden. Nach der Beladung der MHC-Moleküle gelangen diese wahrscheinlich auf direktem Weg unter Umgehung des Golgi-Apparates (Ackerman et al., 2003) an die Zelloberfläche. Von hier aus wird das phagozytierte, exogene Antigen an CD8 positive zytotoxische T-Zellen präsentiert.

3.2. Dendritische Zellen: Induktion einer Immunantwort oder von Toleranz?

Dendritische Zellen spielen sowohl bei der Entwicklung einer Immunantwort als auch bei der Entstehung von Toleranz eine bedeutende Rolle. Die Frage, welche Eigenschaften der DC den Weg in die eine oder die andere Richtung einschlagen lässt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es lässt sich derzeit noch nicht komplett ausschließen, dass zwei verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen existieren – die einen tolerogen, die anderen immunogen (Heath et al., 2004). Auch die Hilfe von CD4 T-Helfer-Zellen mag in vivo hier eine Rolle spielen (Guermonez and Matzinger, 1992). Die gängigste Erklärung beinhaltet jedoch, dass eine Art von Gefahren- oder Entzündungs-Signal auf die dendritischen Zellen einwirkt, die dadurch ihren Differenzierungsstatus ändern und somit den Schlüssel für eine positive Immunantwort darstellen (Bellone, 2000; Heath et al., 2004; Matzinger, 1994).

3.2.1 Reif oder unreif – zwei verschiedene Stadien der Dendritischen Zellen

In den meisten Geweben findet man Dendritische Zellen in einem sogenannten „unreifen“ Stadium. In diesem Differenzierungsstatus exprimieren die Zellen nur wenige der akzessorischen Signale, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind (Inaba et al., 1994). So finden sich hier nur geringe Mengen der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD80 und CD86 auf der Oberfläche der Zellen. Das gleichzeitig niedrige Expressionsniveau von MHC-Molekülen macht die dendritischen Zellen in diesem Stadium zu nur schlechten T-Zell-Stimulatoren. Ausgeprägt ist zu diesem Zeitpunkt jedoch ihre Fähigkeit, Antigene aufzunehmen (Inaba et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Sallusto et al., 1995). So findet sich jetzt unter anderem eine hohe Expression an für die Phagozytose wichtigen Fc γ und Fc ϵ Rezeptoren (Banchereau and Steinman, 1998).

All diese Eigenschaften der dendritischen Zellen ändern sich jedoch rasch, wenn sie einen Stimulus als Reifungs-Signal erhalten. Zu diesen gehören mikrobielle Produkte wie Doppelstrang-RNA, Flagellin oder LPS (Heath et al., 2004). Erkannt werden diese Signale über sogenannte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptor, PRR), zu denen auch die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (Reis e Sousa, 2001) gehört. Der Toll-like-Rezeptor 4 zum Beispiel wird jedoch nicht nur durch den bakteriellen Bestandteil LPS aktiviert (Lutz and Schuler, 2002), sondern erkennt auch endogene Liganden wie Fibrinogen (Smiley et al., 2001), Heparan Sulfat (Johnson et al., 2002), die Fibronectin A-Domäne (Okamura et al., 2001) und Hitze-Schock-Proteine 60 und 70 (Ohashi et al., 2000). Als weitere endogene Gefahrensignale wurden Harnsäure (Shi et al., 2003) und HMGB1 (Scaffidi et al., 2002) identifiziert. Zu den Zytokinen, die eine DC-Reifung induzieren, gehören unter anderem IL-1 und TNF – durch IL-10 wird eine Reifung blockiert (Banchereau and Steinman, 1998). Wichtig scheint weiterhin eine CD40 – CD154 Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen zu sein (Ridge et al., 1998), auch wenn es wohl CD40-unabhängige Mechanismen gibt (Schuurhuis et al., 2000).

Dendritische Zellen, die derartige Signale empfangen, erfahren einen „Reifungsprozess“ (Banchereau and Steinman, 1998): Hierbei werden Oberflächenmoleküle verstärkt exprimiert, die wichtig für die T-Zell-Stimulation sind. So kommt es zur vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle, zu denen

unter anderem CD80, CD86 und CD40 zählen. Es wird vermehrt Antigen auf MHC-Molekülen präsentiert, die sich nun zahlreicher an der Zelloberfläche befinden. All diese neu erworbenen Eigenschaften dienen dazu, aufgenommenes Antigen in optimaler Weise mit zahlreichen unterstützenden Mechanismen an T-Zellen zu präsentieren, die dadurch in Effektor-T-Zellen umgewandelt werden sollen. Erleichtert wird dies noch dadurch, dass dendritische Zellen nach Aktivierung in lymphatische Gewebe wandern (Sallusto and Lanzavecchia, 1999), um dort eventuell ihren Reifungsprozess zu vollenden (Kitajima et al., 1996) und B- und T-Lymphozyten durch die Sekretion von Chemokinen anzulocken (Adema et al., 1997). Zu den proinflammatorischen Zytokinen, die in diesem Rahmen von dendritischen Zellen produziert werden, gehören IL-12p40 und p70, TNF, IL-1 β und IL-6 (Menges et al., 2002). Nach der Reifung verlieren die dendritischen Zellen jedoch auch ein vorher stark ausgeprägtes Merkmal: Die Fähigkeit zur Phagozytose sinkt auf 1/4 bis 1/5 der Kapazität der unreifen dendritischen Zellen (Albert et al., 1998a). Dendritische Zellen können sich somit in einem Reifungsprozess von effektiven Phagozyten, die jedoch nicht immunstimulatorisch wirken, zu produktiven Effektor-T-Zell-Induktoren entwickeln.

3.2.2 Konsequenzen der Aufnahme apoptotischer und nekrotischer Zellen

Wie unter Punkt 2 beschrieben, sind dendritische Zellen in der Lage, apoptotische und nekrotische Zellen aufzunehmen. Das immunstimulierende Potential der DC, die diese toten Zellen internalisiert haben ist jedoch bis heute stark umstritten. Klarer erscheint, dass die aufgenommenen, von den toten Zellen stammenden Antigene durch die DC präsentiert werden, und das nicht nur auf MHC-Oberflächenmolekülen der Klasse II, sondern auch auf Klasse I und somit an zytotoxische T-Lymphozyten (Albert et al., 1998a; Chiodoni et al., 1999; Inaba et al., 1998; Larsson et al., 2001; Yrlid and Wick, 2000 und siehe Punkt 3.1.1). Die Konsequenzen einer derartigen Präsentation bleiben jedoch unklar: Erfolgt eine Immunantwort oder führt sie zur Toleranz?

Eine gängige Meinung stellt die Annahme dar, dass apoptotische Zellen einen immunsuppressiven Effekt auf die aufnehmenden Phagozyten haben: So zeigte sich, dass Makrophagen, die mit UV-bestrahlten und somit apoptotischen Zellen inkubiert werden, bei Stimulation mit LPS signifikant weniger proinflammatorische Zytokine

TNF, IL-1 β und IL-12 und größere Mengen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 produzieren (Voll et al., 1997). Hier scheint der Prozess der Phagozytose eine wichtige Rolle zu spielen, da dieser Effekt auch durch Ligation des CD36-Rezeptors erreicht werden konnte. Fadok et al. konnten belegen, dass eine *in vivo* Aufnahme apoptotischer Zellen zu vermehrter Sekretion von TGF β , Prostaglandin E2 und Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF) in Makrophagen führt, die wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine reduzieren können (Fadok et al., 1998). Dabei könnte eine Beteiligung des Phosphatidylserin-Rezeptors von Bedeutung (Fadok et al., 2000) sein. Ähnliches konnte bei dendritischen Zellen beobachtet werden: Nach Ingestion von apoptotischen Zellen sinkt die Endotoxin-induzierte Produktion von IL-12 so wie auch die Fähigkeit, das kostimulatorische Molekül CD86 in vermehrtem Maße zu exprimieren – daraus resultiert eine verminderte Kapazität zur T-Zell-Stimulation (Stuart et al., 2002). Auch in *in vivo* Experimenten wurde gezeigt, dass gegenüber Antigenen aus apoptotischen Zellen, die von dendritischen Zellen aufgenommen wurden, Toleranz induziert wird – vorausgesetzt, die dendritischen Zellen erhalten nicht gleichzeitig ein Reifungssignal wie zum Beispiel CD40-Ligation (Liu et al., 2002).

In derartigen Experimenten wird oft die immunogene Potenz apoptotischer Zellen mit der nekrotischer Zellen verglichen. Dabei erscheinen meist nekrotische, nicht jedoch apoptotische Zellen die Maturation von dendritischen Zellen induzieren zu können und sie somit zur Stimulation von T-Zellen zu befähigen (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000). Dies mag zum Teil daran liegen, dass nekrotische, aber nicht apoptotische Zellen Heat Shock – Proteine freisetzen, die dendritische Zellen aktivieren, indem sie den NF- κ B- Transduktionsweg induzieren (Basu et al., 2000; Li et al., 2001; Vabulas et al., 2002). Hitze-Schock – Proteine (besonders hsp70) scheinen auch eine Rolle zu spielen, wenn in Tumorzellen Nekrose durch Gancyclovir induziert wird – dies führt im Gegensatz zu apoptotischem Zelltod zu einer starken anti-Tumor- Immunantwort (Melcher et al., 1998). Weiterhin wurde das Protein HMGB1 als Faktor identifiziert, der von nekrotischen Zelle freigesetzt wird und ein inflammatorisches Signal darstellt (Scaffidi et al., 2002).

Einigkeit herrscht über das immunostimulatorische Potential sowohl von nekrotischen als auch von apoptotischen Zellen jedoch nicht: So erwiesen sich apoptotische Zellen in manchen Studien sehr wohl als fähig, in einer Immunantwort zytotoxische T-Lymphozyten zu induzieren: Albert et al. konnten demonstrieren, dass dendritische

Zellen, aber nicht Makrophagen Antigen von Influenza-infizierten apoptotischen Zellen in einer Weise an ihrer Oberfläche präsentieren, dass sie CD8 T-Lymphozyten stimulieren können (Albert et al., 1998b). Erwähnenswert ist hier, dass die Aufnahme nekrotischer Zellen nicht zu einer derartigen Aktivierung führt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Yrlid et al: Während bakterielles Antigen aus mit *Salmonella typhimurium* infizierten apoptotischen Zellen effektiv von aufnehmenden dendritischen Zellen auf MHC I an T-Zellen präsentiert wird, führt die Induktion von Nekrose durch die gleichen Bakterien zu einer drastischen Reduktion der Antigenpräsentation auf MHC I (Yrlid and Wick, 2000). Auch in Tumor-Vakzinierungs-Versuchen konnte gezeigt werden, dass zum Teil apoptotische, aber nicht nekrotische Tumor-Zell-Vakzinen eine potente anti-Tumor-Immunantwort auslösen (Scheffer et al., 2003). Ronchetti et al. beobachteten, dass nach Injektion apoptotischer T-Zell-Lymphom-Zellen eine langdauernde Tumor-spezifische Immunantwort induziert wird. Die Immunogenität der apoptotischen Zellen war dabei proportional zur injizierten Zellzahl und trat nur bei hohen Zellzahlen auf. Assoziiert war dieses Phänomen mit einer erhöhten Serumkonzentration an IL-10 und IL-1 β , die Tumor-Bekämpfung erschien verstärkt in IL-10 knockout Mäusen (Ronchetti et al., 1999). Diese Ergebnisse mögen darauf hinweisen, dass apoptotische Zellen immunstimulierend und –supprimierend wirken können (Bellone, 2000). Wichtig und wegweisend scheinen dabei die An- oder Abwesenheit von Maturationsignalen für die aufnehmenden dendritischen Zellen zu sein (Larsson et al., 2001).

Sicherlich sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Frage der Antigenität toter Zellen zu klären. In dieser Arbeit soll der Einfluss einer Aktivierung vor Zelltodinduktion – wie sie bei bakterieninduzierter Apoptose stattfindet – auf den Reifungszustand der phagozytierenden dendritischen Zelle untersucht werden.

4. Fragestellung

In dieser Arbeit sollte der Zelltod in Phagozyten nach Aufnahme von *E.coli* Bakterien untersucht werden. Dabei konnten wir feststellen, dass die Makrophagen nicht nur wie bereits beschrieben durch Apoptose sterben (Hacker et al., 2002), sondern zum Teil auch dem nekrotischen Zelltod unterliegen. Dies warf folgende Fragen auf:

1. Was sind die Mechanismen der Bakterien-induzierten Apoptose und Nekrose?

2. Werden nekrotische Zellen genauso effektiv wie apoptotische von professionellen Phagozyten aufgenommen?
3. Was ist der Mechanismus der Phagozytose nekrotischer Zellen?
4. Welche Rolle spielt der nekrotische Zelltod in Phagozyten für die Entwicklung einer anti-bakteriellen Immunantwort?
5. Welchen Einfluss hat der Prozess der Aktivierung der Makrophagen vor Zelltodinduktion auf die phagozytierenden dendritischen Zellen?
6. Erfolgt eine effektive Antigenpräsentation an T-Zellen?

Um diese Fragen zu untersuchen, wurden RAW Zellen und primäre Knochenmarksmakrophagen mit *E.coli* Bakterien koinkubiert und anschließend auf Zelltod hin untersucht. Die so behandelten Zellen wurden zusammen mit dendritischen Zellen inkubiert, und das Ausmaß der Phagozytose der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde bestimmt. Der Reifungsgrad der dendritischen Zellen nach Aufnahme wurde anhand der Oberflächenmarker untersucht, die Fähigkeit zur Kreuz-Präsentation aufgenommener Antigene wurde nach Koinkubation mit T-Zellen bestimmt.

II. Material und Methoden

1. Material

1. 1 Geräte

| Gerät | Gerätetyp | Hersteller |
|---|---|---|
| Brutschränke: Bakterien Zellen | WB300 Hera Cell 240 | Mytron, Heiligenstadt Heraeus, Hanau |
| Durchlusszytometriegerät | FACS Calibur | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Elektroporationsgerät | Gene Pulser™ | Biorad, Hercules, CA, USA |
| ELISA-Lesegerät | ELISAreader Argus 400 Microplate Reader | Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA |
| Mikroskope: Lichtmikroskop Fluoreszenzmikroskop Konfokales Mikroskop | ID 03 Leica DM RBE Axiovert 100M Laser Scanning Microscope | Zeiss, Jena Leica, Bensheim Zeiss, Jena |
| pH-Meter | MultiCal pH526 | WTW, Weilheim |
| Photometer | 4054 Ultrospec Plus | Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden |
| Sterilwerkbank | HERAsafe HSP 18 | Heraeus, Hanau |
| Western-Blotting: Blotkammer Elektrophoresekammer Spannungsquelle | Mini Trans-Blot Cell Mighty Small SE260 Mini- vertical Unit EPS 1001 | Biorad, Hercules, Ca, USA Hoefer, San Francisco, CA, USA Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden |

1.2. Chemikalien

Accutase

PAA, Linz, Österreich

| | |
|-------------------------------------|---|
| Acrylamid 30% | Biorad, Hercules, CA, USA |
| Ammoniumchlorid | Sigma, Deisenhofen |
| Ammoniumpersulfat | Sigma, Deisenhofen |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Sigma, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Sigma, Deisenhofen |
| Calciumchlorid | Sigma, Deisenhofen |
| Chemiluminiscence Reagent Plus | PerkinElmer, Boston, USA |
| Coumermycin | Sigma, Deisenhofen |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma, Deisenhofen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma, Deisenhofen |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Fluka, Neu-Ulm |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma, Deisenhofen |
| Eosin Y | Sigma, Deisenhofen |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| FBS (Fetal Bovine Serum) | PAN, Aidenbach |
| | Biochrom, Berlin |
| Formaldehyd-Lösung 37% | Merck, Darmstadt |
| Geneticin | GIBCO, Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA |
| Glutaraldehyd-Lösung | Fluka, Neu-Ulm |
| Glycin | Sigma, Deisenhofen |
| Glycerol | Sigma, Deisenhofen |
| L-Glutamin | Biochrom, Berlin |
| Hepes | Fluca, Neu-Ulm |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumeisencyanid ($K_3Fe(CN)_6$) | Sigma, Deisenhofen |
| Kaliumeisencyanid ($K_4Fe(CN)_6$) | Sigma, Deisenhofen |
| Kanamycin | Sigma, Deisenhofen |
| Lactacystin | Biomol, Hamburg |
| M-CSF | R&D, Wiesbaden-Nordenstadt |
| β -Mercaptoethanol | Sigma, Deisenhofen |
| Magermilchpulver | Fluka, Neu-Ulm |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |

| | |
|---|----------------------------|
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogensulfat | Fluka, Neu-Ulm |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt |
| NP40 | Biochrom, Berlin |
| Penicillin / Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Propidiumiodid | Sigma, Deisenhofen |
| Saccharose | Sigma, Deisenhofen |
| Salzsäure (25%ig) | Roth, Karlsruhe |
| Saponin | Roth, Karlsruhe |
| SB 203580 | Alexis, Grünberg |
| Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) | Merck, Darmstadt |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Roth, Karlsruhe |
| Staurosporin | Sigma, Deisenhofen |
| Sucrose | Sigma, Deisenhofen |
| Tris (hydroxymethyl)-aminomethan | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Trypanblau | Sigma, Deisenhofen |
| Tween 20 | Sigma, Deisenhofen |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |
| Wortmannin | Sigma, Deisenhofen |
| X-Galactosidase | Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Zitronensäure | Roth, Karlsruhe |
| z-VAD-fmk | Bachem, Heidelberg |

1.3. Antikörper

| Name | Herkunft | Eigenschaften | Hersteller |
|---------------------------|----------|---|----------------------------|
| Anti-Ovalbumin | Maus | monoklonaler anti-chicken egg albumin (ovalbumin), Maus IgG1 Isotyp | Sigma, Deisenhofen |
| Anti-Mouse IgG | Ziege | Meerrettich-Peroxidase-konjugiert | Dianova, Hamburg |
| PE anti-mouse CD11c (HL3) | Hamster | PE-konjugiert, Armenian Hamster IgG, | BD Biosciences Pharmingen, |

| | | | |
|---------------------------------------|---------|--|---------------------------------------|
| | | group 1, λ | Heidelberg |
| FITC labeled anti-mouse CD40 (HM40-3) | Hamster | FITC-konjugiert, Armenian Hamster IgM, κ | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| FITC anti-mouse CD80 (16-10A1) | Hamster | FITC-konjugiert, Armenian Hamster IgG, group 2, κ | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| FITC anti-mouse CD86 (GL-1) | Ratte | FITC-konjugiert, Rat IgG _{2A} , κ | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |

1.4. Lösungen, Stammlösungen und Puffer

Western-Blotting

LGB (pH8,8)

182g Tris

4g SDS

32%HCl

auffüllen mit Aqua dest. Auf 1l

UGB (pH6,8)

30g Tris

2g SDS

auffüllen mit Aqua dest. Auf 500ml

4x Proben-Puffer

200mM Tris-HCl pH 6,8

400mM DTT

8% SDS

40% Glycerol

0,1% Bromphenolblau

5x Laufpuffer

125mM Tris-HCl pH8,3

1,25M Glycin

0,5% SDS

TBS

25mM Tris-HCl pH7,4

| | |
|-------------------------------|---|
| | 139mM NaCl 2,7mM KCl |
| TBS/T | TBS plus 0,5% Tween 20 |
| 2x Transferpuffer | 78mM Glyzin 96mM Tris/HCl, pH8,3 20% Methanol |
| Blockierlösung | Magermilch 5% |
| Ammoniumpersulfatlösung (APS) | 10% APS |
| ELISA | |
| ELISA- Waschpuffer | PBS + 0,05% Tween 20 |
| Blockier-Puffer | PBS + 1%BSA + 1% Sucrose |
| Reagenz-Puffer | PBS + 1%BSA |
| Phosphat-Citrat-Puffer | 25,7ml 0,2M Na ₂ HPO ₄ 24,3ml 0,1M Zitronensäure 50ml Aqua dest pH 5,0 |
| Stop-Lösung | 2N H ₂ SO ₄ |
| Annexin V – Färbung | |
| Annexin V – Bindepuffer | 10mM Hepes/NaOH 140mM NaCl 2,5mM CaCl ₂ |
| Sonstige Lösungen: | |
| PBS | 13,7mM NaCl 2,7mM KCl |

| | |
|--------|--|
| D2SC/1 | Murine Dendritische Zelllinie aus der Milz |
| B3Z | T-Zell-Hybridom: T-Zellen transfiziert mit NFAT-lacZ, aktivieren lacZ-Gen bei Stimulation durch Präsentation von OVA auf H-2 K ^b , produzieren dabei quantifizierbare Mengen von β -Galactosidase |

Sämtliche Zellen wurden in RPMI 1640 Medium komplett kultiviert.

D2SC/1 Zellen wurden in Zellkulturschalen 100 x 20mm kultiviert, RAW Makrophagen und B3Z-T-Zellen in 94 x 16mm Petrischalen.

1.7. Bakterienstämme

Für sämtliche Arbeiten wurde der Bakterienstamm Escherichia coli K12 DH5 α verwendet.

1.8. Virus

Zur Infektion von Makrophagen wurde das Vaccinia Virus MVA (Wildtyp) verwendet.

1.9. Zellkulturartikel

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| Falcon Zellkulturschalen 100 x 20mm | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Petrischalen 94/16 mit Nocken | Peske, Aindling |
| Falcon Zellkulturplatten Multiwell, 12-Well | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| 5ml/10ml/25ml Einmal-Pipetten | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellschaber | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Neubauer Zählkammer | Merck, Darmstadt |

1.10. Sonstige Materialien

| Western-Blotting | |
|---|-----------------------------|
| Gel-Blotting-Papier | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Protran Nitrocellulose Transfer Membran | Schleicher & Schüll, Dassel |

| | |
|---|---|
| Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film Proteinmarker SeeBlue | PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, USA Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| Aufnahmeassay | |
| Green Fluorescence Cell Linker Kit PKH67 Red Fluorescence Cell Linker Kit PKH 26 | Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen |
| ELISA | |
| Duoset ELISA Mouse TNF- α - Kit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Tabletten | R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Sigma, Deisenhofen |
| Elektroporation | |
| Gene Pulser Elektroporationsküvette, 0,4cm Elektrodenabstand | Biorad, Hercules, CA, USA |

1.11. Plasmide

| Name | Eigenschaften | Herkunft |
|-----------------|--|--------------------|
| pEF-OVA | Expressionsvektor für OVA, Resistenz gegen Geneticin | Eigene Herstellung |
| pEFflagApGKpuro | Expressionsvektor für Puromycin-Resistenz | Eigene Herstellung |

2. Methoden

2.1 Herstellung von primären dendritischen Zellen und Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen

Aus C57BL/6 Mäusen wurden die beiden Femora und Tibiae präpariert und von Muskel- und Bindegewebe befreit. Nach Einlegen in 70% Ethanol für eine Minute wurden sie in Medium RPMI komplett vorübergehend aufbewahrt. Nach Präparieren aller Beine wurden die Epiphysen der Knochen abgeschnitten und das Knochenmark mithilfe einer 10ml Spritze und einer 27G Nadel in eine unbeschichtete Petrischale

herausgespült. Verwendet wurde auch hier RPMI Medium komplett, 10 ml pro Bein. Nach der Spülung wurden die Zellen in einem 50ml Spitzboden-Röhrchen gesammelt, zentrifugiert und einmal mit 10ml Medium gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen gezählt.

Für die Generation von dendritischen Zellen mithilfe des Wachstumsfaktors GM-CSF wurden daraufhin je 5×10^6 Zellen in Petrischalen mit 10ml RPMI Medium komplett plus GM-CSF (4ng/ml) ausquartiert. GM-CSF stammt aus dem Überstand von Ag8653 Myelomzellen, die mit muriner GM-CSF cDNA transfiziert wurden (Zal et al., 1994). Die Konzentration im Überstand wurde mithilfe eines GM-CSF – ELISAs bestimmt. An Tag drei wurden weitere 10ml RPMI Medium komplett mit 4ng/ml GM-CSF zugegeben. Für die meisten Versuche wurden an Tag sechs die nicht adhärenen Zellen geerntet und in 12-Loch-Platten ausgesät. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten bereits mindestens 50% der Zellen den Dendritischen-Zellen – Oberflächenmarker CD11c. Wurden die Zellen erst später verwendet, wurden an Tag sechs 10ml des Überstands in ein 50ml Spitzbodenröhrchen aufgenommen, zentrifugiert und in 10ml GM-CSF enthaltendem Medium in eine neue Zellkulturschale überführt. Die restlichen 10ml der Petrischale wurden resuspendiert und ohne Zentrifugationsschritt in die neue Zellkulturschale übertragen. An Tag acht wurden wieder 10ml des Überstands zentrifugiert und in 10ml RPMI komplett mit 2ng/ml GM-CSF zurückgeführt. Die Zellen wurden spätestens an Tag 10 geerntet und für Versuche verwendet.

Für die dendritischen Zellen, die in Anwesenheit des FLT3-Liganden generiert wurden, wurden vor dem Zählen der Zellen die Erythrozyten durch Zugabe von 500 μ l Ammonium-Chlorid (8,29g/l) lysiert. Nach einer Minute wurde die Reaktion durch Zugabe von 40ml Medium gestoppt, und die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen. Daraufhin wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in eine kleine Zellkulturflasche in RPMI Medium komplett plus zusätzlich 2mM Glutamin und 35ng/ml FLT3-Ligand ausgesät. An Tag 8 wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet und für folgende Versuche in 12-Loch Platten ausgesät.

Zur Generation von primären Makrophagen aus den Knochenmarksvorläuferzellen wurden je 2×10^7 Zellen in 10ml RPMI Medium komplett in unbeschichtete Petrischalen ausgesät. Zugefügt wurde der Wachstumsfaktor M-CSF in einer Konzentration von 10ng/ml. An Tag drei wurde die gleiche Menge M-CSF erneut zugegeben, die Endkonzentration von M-CSF betrug also 20ng/ml. An Tag acht

wurde der Überstand der Petrischale abgenommen und verworfen, die adhärenen Zellen wurden mithilfe von 3-4ml Accutase vom Boden der Platte abgelöst und für Versuche verwendet.

2.2. Transfektion von Zellen durch Elektroporation

Eine Möglichkeit, fremdes Genmaterial in andere Zellen einzubringen, ist die Elektroporation. Hier werden starke elektrische Impulse angelegt, die die Zellmembranen vorübergehend durchlässig für zum Beispiel DNA machen. Hierdurch soll sich im Gegensatz zu anderen Methoden die Transfektionseffizienz erhöhen lassen.

5×10^6 RAW-Zellen wurden aufgenommen in 420 μ l RPMI Medium mit 25% FCS; 20 μ g Plasmid wurde zugegeben. Aus diesem Gemisch wurden 400 μ l vorsichtig ohne Luftblasen in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Zellen wurden dann bei 280 V und 960 μ F elektroporiert (Biorad Gene Pulser) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Küvetteninhalt wurde in 10ml RPMI Medium mit 0,5% FCS aufgenommen, zentrifugiert, in 10ml RPMI Medium mit 10% FCS resuspendiert und in Zellkulturschalen ausquartiert.

Bei der Transfektion von RAW Zellen mit dem Ovalbumin enthaltenden Plasmid (pEF OVA) wurden die exprimierenden Zellen selektiert durch Zugabe von 700 μ g/ml G418 (=Geneticin), da auf dem Plasmid auch ein Geneticin- Resistenzgen vorhanden ist und somit nichtexprimierende Zellen in Anwesenheit der zytotoxischen Substanz G418 sterben.

RAW K14 Zellen wurden mit einem Gemisch aus 15 μ g pEFOva-Plasmid und 5 μ g pEF16 (PEFflagApGKpuro) für die Puromycin-Resistenz unter denselben Bedingungen doppeltransfiziert. Die exprimierenden Zellen wurden in Puromycin-haltigem (3 μ M) RPMI Medium komplett selektiert.

Nachdem in den Zellkulturschalen Klone der transfizierten, exprimierenden Zellen gewachsen waren, wurden diese unter sterilen Bedingungen gepickt und in 6-Loch-Platten ausgesät. Nach ausreichender Vermehrung der Zellen wurden sie geerntet, als pellet bei -20°C eingefroren und per Western-Blotting auf die Expression von Ovalbumin hin kontrolliert.

2.3. Western-Blotting

Durch diese Methode lassen sich bestimmte Proteine in einer Mischung nachweisen. Zuerst werden die denaturierten Proteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese der Größe nach geordnet, anschließend auf Nitrozellulose übertragen (Blotting) und mit einem für das Protein spezifischen Antikörper markiert. Dieser kann durch einen enzymgekoppelten zweiten Antikörper detektiert werden, durch den das gesuchte Protein dann sichtbar gemacht werden kann.

Zur Überprüfung der Expression von Ovalbumin in transfizierten Zellen wurden die in 2.2. und 2.3 eingefrorenen Zell-Pellets je nach Größe in genügend 1x Proben-Puffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C zur Protein-Denaturierung erhitzt, und wieder auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel bei 14000U zentrifugiert.

Die 12,5 prozentigen Polyacrylamid-Gele wurden aus folgenden Komponenten hergestellt:

| | Trenngel 12,5% | Sammelgel |
|------------------|----------------|-----------|
| LGB / UGB | 7,5 ml | 3,75 ml |
| Acrylamid 30% | 12,6 ml | 2,4 ml |
| H ₂ O | 9,9 ml | 13,8 ml |
| APS 10% | 180µl | 70µl |
| Temed | 30µl | 30µl |

Nachdem das auspolymerisierte Trenngel vorübergehend zum Erreichen einer klaren Trennlinie mit Buthanol überschichtet wurde, erfolgte das Gießen des Sammelgels auf das Trenngel. Das fertige Gel wurde in die Laufkammer eingespannt, die dann mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. Darauf folgte die Ladung des Gels mit 10-20µl der vorbereiteten Proben und dem Molekulargewichtsmarker SeeBlue (5-10µl). Die Elektrophorese wurde gestartet bei einer Spannung von 130V und einer maximalen Stromstärke von 400mA; nachdem die Bande des Markers das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 180V erhöht. Als die Farbstofffront den unteren Gelplattenrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, das Gel herausgenommen und zusammen mit der bereits in Transferpuffer eingeweichten Nitrozellulosemembran in die Blotting-Kammer transferiert. Hier erfolgte der eineinhalbstündige Transfer der Proteine auf die Membran in Transferpuffer bei 4°C. Die angelegte Spannung betrug 100 Volt, die maximale Stromstärke 400mA.

Nach diesem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in Magermilch als Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine mindestens

einstündige Inkubation mit dem in Magermilch gelösten Anti-OVA-Antikörper (1:5000 verdünnt). Die Membran wurde auf dem Schüttler dreimal für jeweils 10 Minuten mit dem Waschpuffer TBS/T gewaschen und dann für eine weitere Stunde mit dem ebenfalls in Magermilch gelösten Zweitantikörper Goat-anti-mouse IgG (1:3000) inkubiert. Nach einem weiteren halbstündigen Waschschrift, während dessen der Waschpuffer dreimal erneuert wurde, wurde der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper mithilfe eines Chemilumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht. Dabei wurde die Membran für eine Minute mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus inkubiert. Dieses Reagenz enthält Luminol als Substrat für das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase. Bei Anwesenheit beider Komponenten, also an den Banden des gesuchten Proteins, kommt es zur Lichtemission, die durch Auflegen eines Films auf die Membran sichtbar gemacht werden kann. Nach dieser Belichtung und Entwicklung des Chemilumineszenzfilms in der Dunkelkammer konnten anhand des Molekulargewichtsmarkers die gesuchten und detektierten Proteinbanden identifiziert werden.

2.4. Zelltodinduktion

2.4.1 Zelltod durch UV-Bestrahlung oder Behandlung mit Staurosporin

Zur Apoptoseinduktion durch UV-Bestrahlung wurden je 5×10^5 RAW / RAW K14 Makrophagen in 1ml RPMI Medium komplett in 12-Loch Platten ausgesät und solange kultiviert, bis sie fest am Boden der Platte anhafteten. RAW K14 Zellen, die vor Bestrahlung aktiviert werden sollten, wurden mindestens 6 Stunden vor UV-Bestrahlung in der Gegenwart von Coumermycin ($1\mu\text{M}$) kultiviert. Dann wurde das Medium mit einer 1ml Pipette abgenommen und die 12-Loch Platten nach Abnahme des Deckels im UV Stratalinker für 1 Minute bestrahlt ($\sim 1600 \text{ J/m}^2$). Der jeweilige Überstand wurde wieder auf die entsprechenden Proben pipettiert, die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume weiter kultiviert.

Bei Zelltodinduktion durch Staurosporin wurden je 5×10^5 RAW Makrophagen in 1ml RPMI Medium komplett in 12-Loch Platten ausgesät und in Gegenwart von Staurosporin ($1\mu\text{M}$) über Nacht für 16-20h kultiviert. Wurden die Zellen vor Apoptoseinduktion mit LPS ($0,1\text{-}1\mu\text{g/ml}$) aktiviert, so geschah dies mindestens 2h vor Zugabe von Staurosporin.

2.4.2 Koinkubation von Makrophagen mit Bakterien

Am Vortag wurden *E.coli* DH5 α Bakterien entweder direkt aus dem bei -70°C eingefrorenen Bakterienstock oder nach Ausstreichen auf einer Agar-Platte in 100ml Luria-Bertani (LB) Medium eingerührt und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in zwei 50ml Spitzboden-Röhrchen für 10 Minuten bei 4000U/min und 4°C zentrifugiert, einmal mit 10ml PBS gewaschen, in ein einziges 50ml Röhrchen übertragen und nochmals zentrifugiert. Nach Resuspension in 10ml PBS wurden die Bakterien durch einen $5\mu\text{m}$ Filter (Sartorius) gedrückt, am Photometer wurde durch Zugabe von PBS eine optische Dichte von 2,0 bei einer Wellenlänge von 600nm eingestellt. Bei der Verwendung von hitzeinaktivierten Bakterien folgte daraufhin eine halbstündige Inkubation bei 65°C . Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Bakterien für Versuche verwendet. Je 5×10^5 RAW Zellen wurden in einem Volumen von 2,5ml RPMI Medium komplett in ein 5ml-Röhrchen aufgenommen. 250 μl der Bakteriensuspension wurden hinzugefügt und die Zellen bei 37°C eine Stunde lang kultiviert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen dann einmal mit PBS gewaschen, um einen Großteil der Bakterien zu entfernen, und weiter bei 37°C in 12-Loch-Platten in einem Volumen von 1ml RPMI Medium komplett inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden sie für Versuche verwendet.

Bei Verwendung von z-VAD.fmk zur Apoptoseinhibition wurden die Zellen nach einstündiger Inkubation mit Bakterien und dem Waschschrift in 12-Loch Platten in Anwesenheit des Caspaseninhibitors z-VAD.fmk (25 μM) kultiviert.

Zur Inhibition der Stimulation wurden schon während der Koinkubation mit Bakterien als auch nach dem Waschschrift die Zellen in Gegenwart der Kinaseinhibitoren Wortmannin (0,1 μM), Lactacystin (5 μM) und SB 203580 (10 μM) kultiviert.

2.5. Zelltod – Untersuchungen

2.5.1 Hoechst – Färbung zum Nachweis von Apoptose

Zellen, die dem Prozess der Apoptose unterliegen, zeigen nicht nur biochemische und molekulare, sondern auch morphologische Veränderungen. Neben der Bildung von Ausstülpungen und Bläschen der Cytoplasmamembran, das sogenannte „membrane blebbing“, und einer Verringerung des Zellvolumens, zeigt auch der Kern morphologische Veränderungen: Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich zu einem typischen Muster. Durch den Farbstoff Hoechst 33342, ein

„vitaler“ interkalierender DNA-Farbstoff, der vorzugsweise an A-T Basenpaare bindet, können diese Veränderungen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Für diese Färbung wurde zu den Zellen nach Apoptoseinduktion beziehungsweise zu den unbehandelten Kontrollen in der 12-Loch Platte an den jeweils angegebenen Zeitpunkten der Hoechst-Farbstoff 33342 in einer Endkonzentration von 5µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 bis 30 Minuten wurden die Zellen in 5ml Röhrchen übertragen, zentrifugiert, in einem kleinen Volumen PBS (10µl) auf einen Objektträger aufgebracht und am Fluoreszenzmikroskop nach ihrer Kernmorphologie ausgewertet. Ausgezählt wurden pro Probe mindestens 300 Zellen, der Prozentsatz der apoptotischen Zellen wurde berechnet.

2.5.2 Eosin / Trypanblau – Vitalfärbungen

Ein Kennzeichen lebender Zellen, aber auch von Zellen in frühen Apoptosestadien, ist die Integrität der Plasmazellmembran. Ein Routineverfahren, diese Zellen von nekrotischen Zellen mit nicht mehr intakter Plasmamembran zu unterscheiden, ist die Färbung mit Eosin oder Trypanblau. Diese Tests beruhen darauf, dass bei lebenden Zellen diese Farbstoffe nicht in das Zellinnere gelangen können, während tote Zellen den betreffenden Farbstoff aufnehmen. Eosin und Trypanblau sind saure Farbstoffe, die als Anionen im Inneren der Zelle an Proteine binden können. Serumfreie Färbung und kurze Färbedauer müssen beachtet werden.

Um den Anteil der nekrotischen Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden die 5×10^5 RAW Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Nekroseinduktion durch mehrfaches Spülen mit einer 1000µl-Pipette aus den 12-Loch Platten abgelöst, zentrifugiert und in einem Volumen von 20µl PBS resuspendiert. 10µl dieser Suspension wurden auf einen Objektträger aufgetragen und dort mit 2,5µl des jeweiligen Farbstoffes vorsichtig vermischt (Endkonzentration jeweils 0,1%). Darauf folgte unverzüglich die Auswertung der Zellen unter dem Lichtmikroskop. Gezählt wurden pro Probe mindestens 300 Zellen, der Anteil der roten (Eosin-Färbung) beziehungsweise blauen (Trypanblau-Färbung) positiven Zellen wurde berechnet.

2.5.3 Annexin V / Propidiumiodid-Färbung

Ein frühes Merkmal apoptotischer Zellen ist die Exposition von Phosphatidylserin, das sich normalerweise nur an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran befindet, auf der Außenseite der Plasmamembran. Diese Exposition ist nicht nur sehr wichtig für die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten, sondern stellt auch eine Möglichkeit dar, früh apoptotische Zellen zu detektieren. So kann man mithilfe von Annexin V, einem natürlichen Liganden von Phosphatidylserin, dessen Exposition in den frühen Phasen der Apoptose verfolgen. Im Gegensatz dazu tritt ein Verlust der Integrität der Plasmamembran erst in späten Stadien der Apoptose auf (Koopman et al., 1994). Durch eine Färbung der zu untersuchenden Zellen mit Propidiumiodid, einem DNA-Farbstoff, der durch intakte Membranen nicht perfundiert, und gleichzeitig Annexin V, können somit apoptotische von nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Die Zellen, die auf Zelltod hin untersucht werden sollten, wurden durch mehrmaliges Spülen mit der 1ml-Pipette aus den 12-Loch Platten entfernt, in 5ml Röhrchen transferiert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Die je 5×10^5 RAW Makrophagen wurden dann in einem 1,2ml FACS – Mikro-Röhrchen in 100 μ l Annexin V Bindepuffer aufgenommen. Dazu wurden je 5 μ l Annexin V-FITC und 10 μ l Propidiumiodid (Endkonzentration 5 μ g/ml) pipettiert. Nach vorsichtigem Vortexen wurden die Zellen für 15 Minuten im Dunklen bei 4°C inkubiert, mit 400 μ l Bindepuffer aufgefüllt und innerhalb von einer halben Stunde per Durchflusszytometrie analysiert.

2.6. Aufnahmeassay

2.6.1 Färbung der Zellen für Koinkubation

Vor Bakterienexposition beziehungsweise Zelltodinduktion erfolgte die Färbung der RAW Makrophagen mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff PKH 67 (Sigma, Deisenhofen). Dazu wurden 4-5 $\times 10^6$ Zellen einmal mit PBS gewaschen und in einem 5ml FACS Röhrchen in 100 μ l Diluent C resuspendiert. Kurz vor der Färbung wurde ein intermediärer stock der Färbelösung in Ethanol mit einer Konzentration von 2×10^{-4} M (ursprüngliche Konzentration 1×10^{-3} M) hergestellt. Durch Zugabe von 2 μ l dieses stocks zu 98 μ l Diluent C und vorsichtiges Vermischen dieser Färbelösung mit den 100 μ l Zellsuspension (siehe oben) wurde ein Farbstoffendkonzentration von 2×10^{-6} M erreicht. Die Zellen wurden so für drei Minuten bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Schwenken inkubiert, bevor die Färbung durch Zugabe von 200 μ l 1% BSA gestoppt wurde. Nach einer weiteren Inkubation von einer Minute erfolgte eine

Verdünnung der Zellsuspension durch Zugabe von 200µl RPMI Medium komplett. Die Zellen wurden daraufhin drei Mal mit PBS gewaschen und für Aufnahmestudien verwendet.

Dendritische Zellen der Zelllinie D2SC/1 wurden vor Koinkubation mit RAW Makrophagen rot gefärbt mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26. Das Protokoll gleicht dem der Färbung mit PKH 67.

Primäre dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen wurden erst nach der zweistündigen Koinkubation mit RAW Makrophagen identifiziert. Dies geschah durch Färbung mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen den für dendritische Zellen spezifischen Oberflächenmarker CD11c. Dazu wurde die gemischte Zellpopulation nach zwei Stunden der Kokultivierung durch mehrfaches Spülen mit der Pipette aus den 12-Loch Platten in 5ml Röhrchen überführt und wie unter Punkt 2.8.2 mit dem PE-CD11c – Antikörper gefärbt.

2.6.2 Koinkubation von dendritischen Zellen und Makrophagen

Nach Färbung der Zellen (siehe oben) wurden je $2,5 \times 10^5$ dendritische Zellen in einem Volumen von 1000µl RPMI Medium komplett in 12-Loch Platten ausgesät. In RAW Makrophagen wurden entweder durch Inkubation mit *E.coli* Bakterien/ MVA Virus, UV-Bestrahlung oder Staurosporin Zelltod induziert (siehe oben), und die so behandelten Zellen beziehungsweise die unbehandelten Kontrollen dann für die angegebenen Zeiträume in 12-Loch Platten in 1ml RPMI Medium komplett kultiviert. Kurz vor der Koinkubation wurden die RAW Makrophagen durch mehrfaches Spülen aus den Platten herausgelöst und in 5ml - Röhrchen überführt. Sie wurden dann zentrifugiert, in einem Volumen von 50µl RPMI Medium komplett resuspendiert und zu den dendritischen Zellen in die 12-Loch Platte pipettiert. Die Zellen wurden so für zwei Stunden im Brutschrank koinkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie durch mehrfaches Pipettieren aus den 12-Loch Platten abgelöst und in 5ml- Röhrchen aufgenommen. Proben mit Zellen der Zelllinie D2SC/1 wurden dann für 20 Minuten mit 2% Formalin fixiert, in 1,2ml FACS-Mikroröhrchen übertragen und per Durchflusszytometrie analysiert. Proben, die primäre dendritische Zellen enthielten, wurden nach der unter 2.8 beschriebenen Methode mit dem CD11c-PE Antikörper gefärbt, um dendritische Zellen zu identifizieren, bevor sie fixiert und analysiert wurden.

2.7. Untersuchung des Reifungszustandes dendritischer Zellen

2.7.1 Koinkubation von dendritischen Zellen und Makrophagen für Reifungsuntersuchung der dendritischen Zellen beziehungsweise Kreuz-Präsentation

An Tag eins des Versuchs wurden je 5×10^5 RAW K14 Zellen in einem Volumen von je 1ml RPMI Medium komplett in 12-Loch Platten ausgesät, zum Teil durch Zugabe von Coumermycin ($1\mu\text{M}$) aktiviert und so für 7-8 Stunden inkubiert. RAW K14 Zellen exprimieren ein Fusionskonstrukt aus MyD88 und E.coli Gyrase B. Durch Coumermycin kann Gyrase B und dadurch auch Myd88 dimerisiert werden, was in den Zellen zu den Folgen einer Toll like Rezeptor – Aktivierung führt. Dann wurde das Medium aus den 12-Loch Platten mit einer 1ml-Pipette abgenommen, und die Platten wurden unter derartig serumfreien Bedingungen eine Minute lang (Dosis $\sim 1600\text{J}/\text{m}^2$) im UV-StrataLinker bestrahlt. Der jeweilige Überstand wurde wieder zu den entsprechenden Proben pipettiert, die Zellen wurden über Nacht (16-20 Stunden) inkubiert.

An Tag zwei wurden die primären Knochenmarks- dendritischen Zellen an ihrem Generationstag sechs geerntet, es wurden je $2,5 \times 10^5$ (für folgenden Präsentationsassay 5×10^5) Zellen abzentrifugiert und in einem Volumen von $50\mu\text{l}$ RPMI Medium komplett zu den RAW K14 Makrophagen in die 12-Loch Platte pipettiert. Zugefügt wurde der Wachstumsfaktor GM-CSF in einer Konzentration von $4\text{ng}/\text{ml}$. So wurden die Zellen für 20-24 Stunden koinkubiert.

An Tag drei wurden die Zellen aus den 12-Loch Platten durch mehrmaliges Spülen, einen Zellschaber oder unter Verwendung von Accutase abgelöst und für die Reifungsuntersuchung der dendritischen Zellen beziehungsweise Koinkubation mit T-Zellen zur Überprüfung der Kreuz-Präsentation verwendet.

2.7.2 Färbung von dendritischen Zellen nach Oberflächenmarkern

Durch Zellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern und folgender Durchflusszytometrie ist es möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu detektieren. So kann man zum Beispiel dendritische Zellen über das Vorhandensein eines bestimmten Oberflächenmarkers, nämlich CD11c, identifizieren, und den Reifungsbeziehungsweise Aktivitätszustand dieser Zellen über das Expressionsniveau der Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und CD40 analysieren.

Die kokultivierten dendritischen Zellen und Makrophagen wurden durch Spülen mit der 1ml Pipette aus den 12-Loch Platten abgelöst, in 5ml Röhrchen überführt, zentrifugiert und in einem Volumen von 150µl PBS 2%FCS in eine 96-Loch V-Boden-Platte übertragen. Die Platte wurde zentrifugiert und ausgeklopft, die einzelnen Proben wurden in 10µl Fc Block (1:10 verdünnt in PBS 2%FCS) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe des Fluoreszenzmarkieren Antikörpers CD80-FITC, CD86-FITC oder CD40-FITC und CD11c-PE in einem Volumen von 90µl (1:100 verdünnt in PBS 2%FCS) und eine weitere Inkubationszeit von einer halben Stunde auf Eis. Die Proben wurden daraufhin zweimal mit PBS (ohne FCS) gewaschen, in 2% Formalin für 20 Minuten fixiert, in 1,2ml FACS-Mikro-Röhrchen übertragen und per Durchflusszytometrie analysiert.

2.8. Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur, zum Beispiel Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns, der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen.

Mindestens 1×10^4 Zellen pro Probe wurden so analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der Software „Cell Quest Pro“ ausgewertet.

2.9 TNF - ELISA

Der ELISA ist ein immunologischer Test, mit dem Antigene (oder auch Antikörper) nachgewiesen werden können. Der spezifische Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen wird an die Wand des Probengefäßes fest gebunden; daran lagert sich das Antigen der Probenlösung an. Enzym gekoppelte Antikörper werden zugesetzt und binden sich an jedes im Erstschrift fixierte Antigen-Molekül. Die Enzymaktivität wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch gemessen und stellt ein quantitatives Maß für das in der Probe enthaltene Antigen dar.

An Tag eins des Versuchs wurden die 96-Loch ELISA-Platten, die aus einem Kunststoff hergestellt sind, an den sehr leicht Proteine binden können, mit dem ersten Antikörper gegen TNF α (Konzentration 0,8 μ g/ml, gelöst in PBS) in einem Volumen von 100 μ l pro well durch Inkubation über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit dem ELISA-Waschpuffer (PBS 0,05%Tween 20) gewaschen, trocken geklopft; durch zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 200 μ l Blockier-Puffer wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift.

Die Überstände der wie angegeben behandelten Zellen wurden aus den 12-Loch Platten abgenommen und zentrifugiert; der Überstand davon wurde gegebenenfalls vorübergehend bei -80°C eingefroren oder direkt für die TNF α Bestimmung verwendet. Die Überstände wurden 1:1 mit RPMI Medium komplett verdünnt und in einem Volumen von 100 μ l auf die Platten aufgebracht. Eine 7-Punkte-Standardkurve wurde mit einem TNF α -Standard nach folgendem Schema hergestellt: Es wurden jeweils 100 μ l RPMI Medium komplett pro well vorgelegt, 100 μ l des Standards (150ng/ml) wurden in das erste Loch hinzupipettiert, und 100 μ l dieser 1:1 Verdünnung in gleicher Weise in das nächste Loch übertragen. Auf diese Weise wurden Konzentrationen von 75ng/ml bis 1,17ng/ml erreicht. Die Proben und der Standard wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der biotinylierte Detektionsantikörper in einer Konzentration von 300ng/ml und einem Volumen von 100 μ l Reagenzpuffer (PBS 1%BSA) auf die Platte aufgebracht, die Platte wurde so für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte wieder ein dreimaliges Waschen mit dem ELISA Waschpuffer.

Im nächsten Schritt wurde an den biotinylierten Antikörper Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP, R&D, 1:200 in je 100 μ l Reagenzpuffer)

durch halbstündige Inkubation gekoppelt. Das Substratreagenz für die Meerrettichperoxidase wurde nach folgendem Schema hergestellt:

10ml 0,05M Phosphat-Citrat-Puffer pH5,0

2µl H₂O₂ 30%

1 Tablette Tetramethylbenzidine

Je 100µl dieses Substratreagenz wurden nach einem weiteren Waschschrift für 10 bis 20 Minuten auf die Platte aufgebracht, bis die Standardproben einen eindeutig blauen Farbumschlag zeigten. Dann wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von je 100µl Schwefelwasserstoff (2N H₂SO₄). Die mit der TNF α Konzentration der ursprünglichen Proben korrespondierenden optischen Dichten der einzelnen wells wurden am ELISA Reader innerhalb von 30 Minuten bei 450nm bestimmt.

2.10 Präsentationsassay

Die nach Punkt 2.8.1 mit OVA RAW Zellen koinkubierten dendritischen Zellen wurden in 5ml Röhrchen überführt, zentrifugiert und in 1ml RPMI Medium komplett aufgenommen. 100µl dieser Zellsuspension (also je 5×10^5 dendritische Zellen und 5×10^5 RAW Makrophagen) wurden in eine 96-Loch Flachbodenplatte transferiert und einmal mit RPMI Medium komplett gewaschen. Die Platte wurde wieder zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und je 1×10^5 B3Z T-Zellen wurden in einem Volumen von 200µl RPMI Medium komplett in die Platte zu den Makrophagen und dendritischen Zellen pipettiert. Zugefügt wurden noch der dendritische Zellen – Wachstumsfaktor GM-CSF (4ng/ml) und 2 Mercaptoethanol (50µM). Als Positivkontrolle diente eine Probe mit dendritischen Zellen, die durch Zugabe von SIINFEKL (0,2mM) von außen mit diesem Peptid beladen wurden und es so an T-Zellen präsentieren konnten. Die Zellen wurden über Nacht (17-22h) bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgte eine Fixierung der Zellen mit je 150µl Glutaraldehyd 0,5% in H₂O für 10 Minuten, danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen. Die X-Galactosidase-Färbe-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

| | |
|---------------------------------------|------|
| K ₃ KaliumEisenZyanid 0,5M | 10µl |
| K ₄ KaliumEisenZyanid 0,5M | 10µl |
| Magnesiumchlorid 0,2M | 5µl |
| Triton 10% | 10µl |

| | |
|-------------------------|---------|
| 10 x PBS | 100µl |
| X-Galactosidase 40ng/ml | 16,8µl |
| H ₂ O | 851,6µl |

Je 100µl dieser Lösung wurde auf die Zellen aufgebracht und die Platte so für 5-9 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurden unter dem Lichtmikroskop die blauen Zellen pro well ausgezählt.

2.11 Infektion von Makrophagen mit dem Vaccinia-Virus MVA

1,5 x 10⁶ RAW Zellen wurden in einem 5ml-Röhrchen mit dem Vaccinia-Virus MVA infiziert. Dazu wurden 7,5 x 10⁶ Viren (das Verhältnis von Virus zu Zelle betrug also 5:1) mit den in RPMI Medium komplett gelösten RAW Zellen zu einem Gesamtvolumen von 150µl aufgefüllt. Das Röhrchen wurde so für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert und darauf die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen (je 5 x 10⁵ RAW pro Loch) in 12-Loch Platten in je 1ml RPMI komplett ausgesät und für die angegebenen Zeiträume kultiviert.

III. Ergebnisse

1. Zelltod in Makrophagen

1.1 Zelltod in Makrophagen nach Kontakt zu *E.coli* Bakterien

RAW 264.7 Zellen wurden koinkubiert mit einer *E.coli* Bakteriensuspension wie unter Methoden Punkt 2.5.2 beschrieben. Hierbei werden die Bakterien effektiv von den Makrophagen aufgenommen. Dies konnte bereits demonstriert werden unter Verwendung von *E.coli* Bakterien, die grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren (Hacker et al., 2002): Nach einstündiger Koinkubation und einem Waschschrift waren unter dem Fluoreszenzmikroskop zahlreiche Bakterien in den RAW Zellen zu sehen. Zwei Stunden später erschien das GFP in vesikulären Strukturen aggregiert, nach vier Stunden war es in zellulären Kompartimenten um den Kern herum zu finden. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits keine bakteriellen Strukturen mehr zu erkennen: RAW Makrophagen scheinen also sehr effektiv innerhalb kurzer Zeit internalisierte Bakterien abbauen zu können.

1.1.1 Bereits vier bis sechs Stunden nach Bakterienkontakt stirbt ein Teil der Makrophagen durch Nekrose

Obwohl die *E.coli* Bakterien noch sehr effektiv abgebaut werden, stirbt ein Großteil der RAW Makrophagen nach Phagozytose. Wir unterscheiden den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose. Nekrose zeichnet sich aus als Zelluntergang, der ohne die typischen apoptotischen Veränderungen in der Morphologie der Zellen stattfindet: Es kommt unter anderem nicht zur Kernschrumpfung und Chromatinkondensation, die Zellen nehmen aber aufgrund ihrer defekten Zellmembran Vitalfarbstoffe auf (siehe Einleitung Punkt 1.1.1 und 1.2.1 und Methoden Punkt 2.5.2). Weiterhin lässt sich diese Art des Zelltodes im Gegensatz zur Apoptose nicht blockieren durch Caspaseninhibition oder Überexpression von Bcl-2.

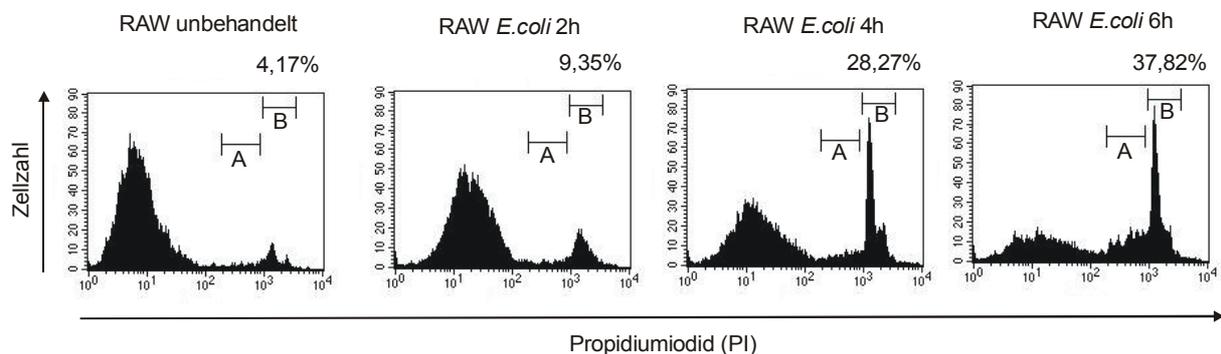
Zur Verlaufsuntersuchung der Plasmamembranintegrität wurden die RAW Zellen nach Phagozytose der Bakterien zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem membranimpermeablen DNA-Farbstoff Propidiumiodid gefärbt. Nur Zellen mit nicht mehr intakter Plasmamembran, also tote Zellen, nehmen diesen Farbstoff auf. Da (spät-) apoptotische Zellen weniger Propidiumiodid aufnehmen und binden, erscheinen sie links der nekrotischen Zellen, die sich je nach Zellzyklusphase und

DNA-Menge als zwei Peaks mit starker Propidiumiodidbindung darstellen. Somit lassen sich durch diese Färbung auch (spät-) apoptotische (geringe PI-Aufnahme) von nekrotischen Zellen (normale PI-Aufnahme) unterscheiden. Frühapoptotische Zellen mit noch intakter Plasmamembran nehmen jedoch unter Umständen gar kein Propidiumiodid auf.

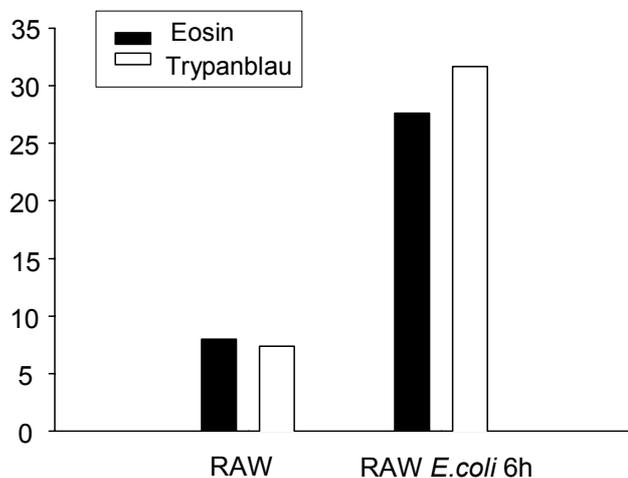
Bereits vier Stunden nach Inkubation mit Bakterien zeigte ein großer Prozentsatz der RAW Zellen eine deutliche Propidiumiodidaufnahme. Innerhalb der propidiumiodid-positiven Population weist der Großteil der Zellen eine normale PI-Aufnahme auf (Marker B), ein Hinweis auf nekrotischen Zelltod. Zu diesem Zeitpunkt ist die Anzahl der apoptotischen Zellen (Marker A) noch gering (Abbildung 1A).

Auch in einer Färbung mit den Vitalfarbstoffen Eosin und Trypanblau, die nur in Zellen mit nicht mehr intakter Membran permeieren und sie damit anfärben können lässt sich dieser frühe Zelltod beobachten: Sechs Stunden nach Phagozytose der Bakterien nimmt eine große Zahl der Makrophagen diese Farbstoffe auf (Abbildung 1B).

1A



1B



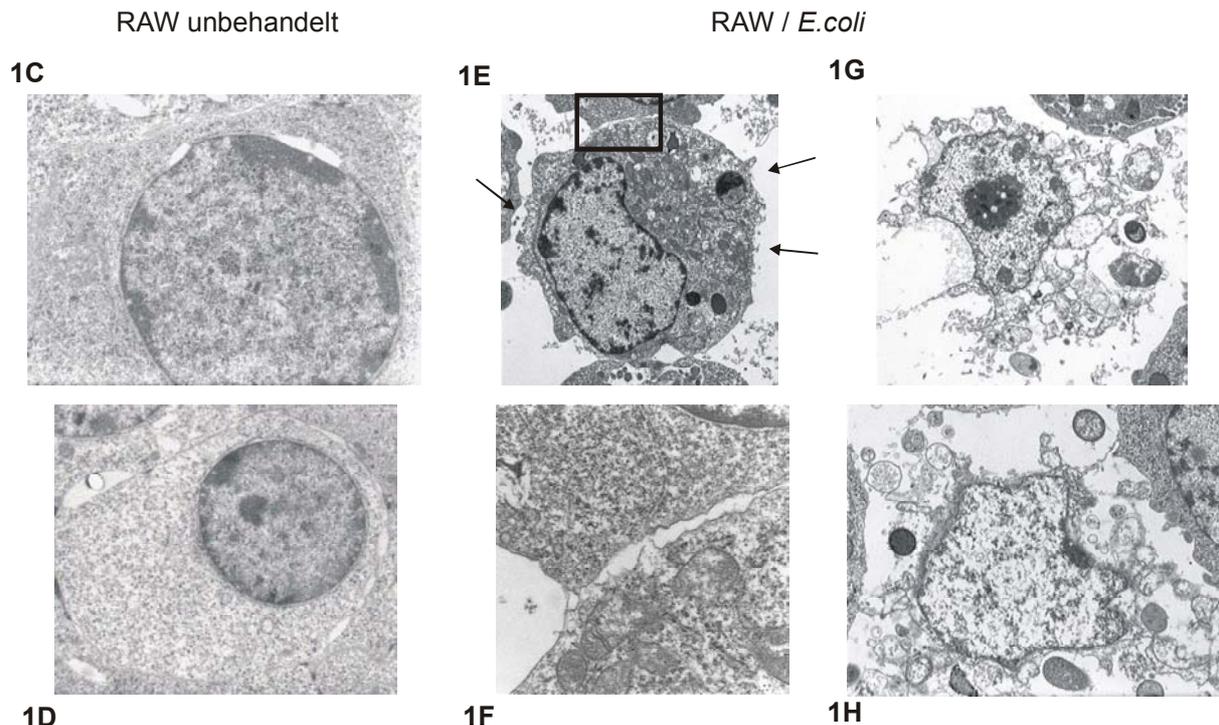


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung der Nekrose in RAW Makrophagen nach Koinkubation mit Bakterien

1A Je 5×10^5 RAW Zellen wurden unbehandelt belassen oder für eine Stunde mit einer Suspension von *E.coli* Bakterien koinkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach einer weiteren Inkubation unter normalen Kulturbedingungen mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, Marker A: sub-G1-peak: (spät-) apoptotische Zellen, Marker B: nekrotische Zellen (Erklärung siehe Text); **1B** 5×10^5 RAW Zellen wurden nativ oder 6 Stunden nach Koinkubation mit Bakterien mit den Vitalfarbstoffen Eosin (schwarzer Balken) und Trypanblau (weißer Balken) angefärbt. Lichtmikroskopisch ausgezählt wurden jeweils mindestens 300 Zellen, angegeben ist der Prozentsatz der Farbstoff aufnehmenden Zellen **1C-H** RAW bzw. RAWBcl-2 Zellen wurden unbehandelt gelassen (1C und D) oder mit Bakterien koinkubiert (1E, F, G und H) und nach 8 Stunden elektronenmikroskopisch untersucht: 1C/D: intakte unbehandelte RAW Makrophagen, 1E: beginnende Desintegration der Plasmamembran (Pfeile), mit Vergrößerung des angegebenen Ausschnitts in 1E, 1G/H: nahezu komplette Desintegration zweier RAW Zellen mit Freisetzung von Zytoplasma und Organellen

Um die Morphologie der Zellen genauer beurteilen zu können, wurden RAW Makrophagen nach Behandlung mit *E.coli* Bakterien unter dem Elektronenmikroskop analysiert. Während sich in unbehandelten RAW (Abbildung 1C) beziehungsweise RAW Bcl-2 (Abbildung 1D) Zellen die Zellplasmamembran noch als intakt und durchgehend erweist, verliert ein Großteil der Zellen dieses Merkmal acht Stunden nach Inkubation mit Bakterien: In Zellen in früheren Stadien der Nekrose (Abbildungen 1E mit Vergrößerung des Rahmens 1F) erscheint die Plasmamembran desintegriert und aufgeschlossen, im fortgeschrittenem Stadium (Abbildungen 1G und 1H) zeigen die Zellen einen kompletten Verlust der Zellmembran mit Freisetzung des Zytoplasmas und der Organellen. Dies geschieht jedoch in Abwesenheit von

morphologischen Merkmalen apoptotischer Zellen wie einer Kondensation des Chromatins im Kern: Die Zellen sterben durch Nekrose.

1.1.2 Zu späteren Zeitpunkten nach Bakterienkontakt tritt Apoptose auf

Während in den ersten sechs bis acht Stunden nach Koinkubation mit *E.coli* Bakterien hauptsächlich Nekrose in den behandelten Makrophagen auftritt, kann zu späteren Zeitpunkten auch eine große Zahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden.

Dies konnte anhand der Kernmorphologie der RAW Zellen nach Behandlung mit Bakterien im Zeitverlauf verfolgt werden: Nach einer Färbung der Zellen mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff Hoechst 33342 wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop nach ihrer Kernstruktur ausgewertet.

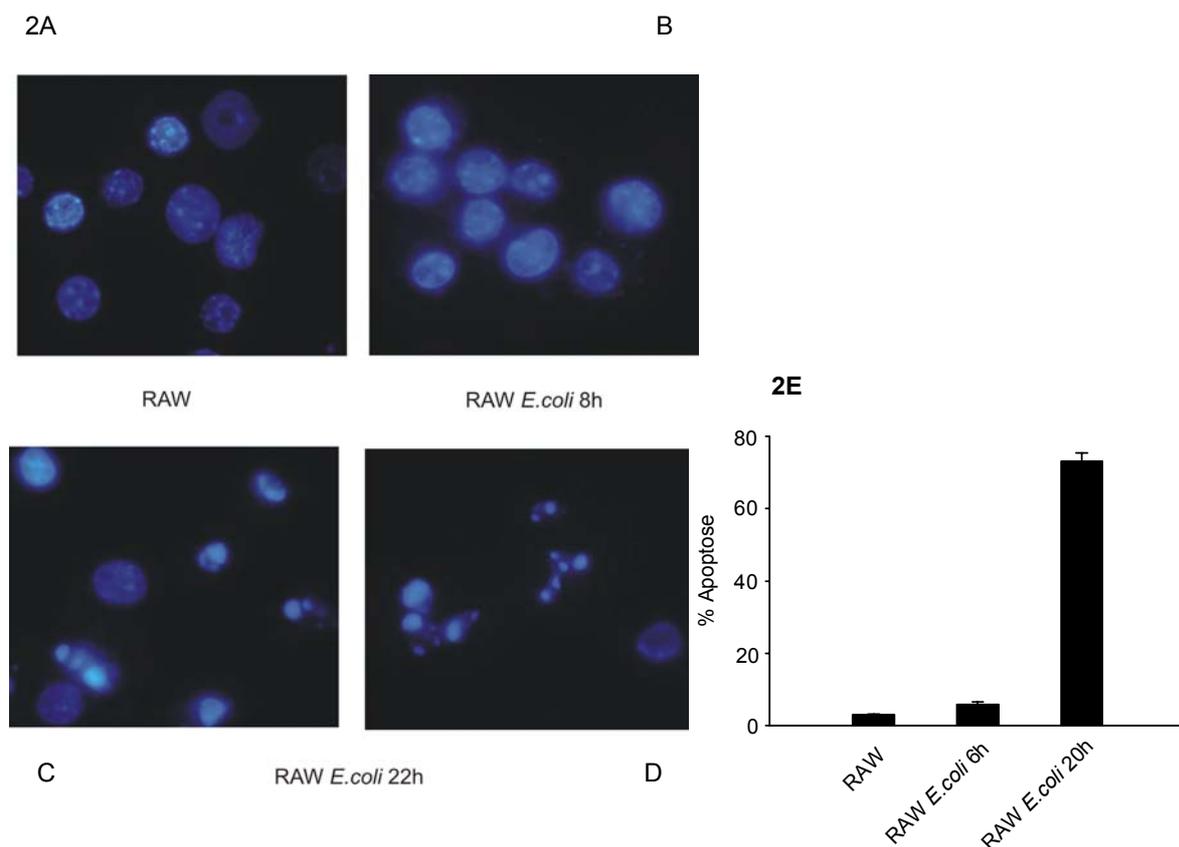


Abbildung 2: Apoptose in Makrophagen nach Koinkubation mit Bakterien

Je 5×10^5 RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt (**2A**) oder zu den angegebenen Zeitpunkten nach Koinkubation mit Bakterien (**2B-D**) mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop photographiert: **2A/B**: normale Kernmorphologie unbehandelter und nekrotischer Zellen 8 Stunden nach Bakterienkontakt, **2C/D**: typische apoptotische Kernmorphologie 22 Stunden nach Koinkubation mit Bakterien. **2E**: Bei wie oben behandelten Zellen wurde der Anteil der apoptotischen Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten anhand der Kernmorphologie bestimmt: Lichtmikroskopisch ausgezählt wurden pro Probe mindestens 300 Zellen, angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei gleich behandelten Proben.

In unbehandelten RAW Makrophagen erkennt man in den blau angefärbten Kernen eine normale Chromatinverteilung (Abbildung 2A). Dies ändert sich nicht bis zu acht Stunden nach Phagozytose der Bakterien, bis zu diesem Zeitpunkt treten kaum apoptotische Zellen auf (Abbildung 2B und 2E). Die hier bereits vorhandenen nekrotischen Zellen unterscheiden sich in ihrem Chromatinmuster nicht von vitalen Zellen. Bei Beobachtung der Zellen 22 Stunden nach Koinkubation mit Bakterien ändert sich das Bild jedoch. Ein Großteil der Zellen weist nun die typischen Morphologie apoptotischer Zellen auf: Die Kerne erscheinen kondensiert und fragmentiert, das Chromatin ist verdichtet zu einem typischen Muster (Abbildung 2C/D). Quantitativ ausgewertet erreicht die Apoptoserate zu diesen Zeitpunkten Werte von 50-80 Prozent (Abbildung 2E).

Als weiteren Nachweis für den Zelltod durch Apoptose konnte bereits in den mit Bakterien behandelten RAW Zellen Caspase 3- und Caspase 9- Prozessierung und auch Aktivierung detektiert werden (Hacker et al., 2002).

Im Rahmen einer zellulären Antwort auf die Phagozytose von niedrig pathogenen *E.coli* Bakterien beobachten wir somit in Makrophagen sowohl Nekrose als auch Apoptose. Ob diese beiden Prozesse jedoch unabhängig voneinander ablaufen und in einer Zelle beide Zelltodformen nebeneinander auftreten können, ist zu diesem Zeitpunkt nicht klar.

1.1.3 Apoptose und Nekrose: Ist ein Nebeneinander dieser beiden Prozesse möglich?

Nekrose und Apoptose können in unserem experimentellen System nicht nur durch ihre verschiedenen Merkmale unterschieden werden, sondern sie treten auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Bis zu acht Stunden nach Inkubation mit Bakterien dominiert Nekrose, anschließend nimmt der Anteil apoptotischer Zellen zu. Bei der Quantifizierung beider Formen des Zelltodes in einem Experiment erreicht die Nekroserate unter den RAW Makrophagen sechs Stunden nach Bakterienkontakt Werte von 30 bis 60 Prozent. Nach 24 Stunden finden sich bei Auswertung der Morphologie der Zellen zu 50 bis 80 Prozent apoptotische Kerne. Ein Beispiel eines derartigen Experiments zeigt Abbildung 3C. Hier fällt auf, dass sich die frühnekrotischen und die spät-apoptotischen Zellen zu einem Prozentsatz von weit über

100% addieren. Dies wirft die Frage auf, ob es möglich ist, dass Zellen, die bereits Merkmale der Nekrose aufweisen, noch aktiv den Signaltransduktionsweg der Apoptose in Gang setzen können.

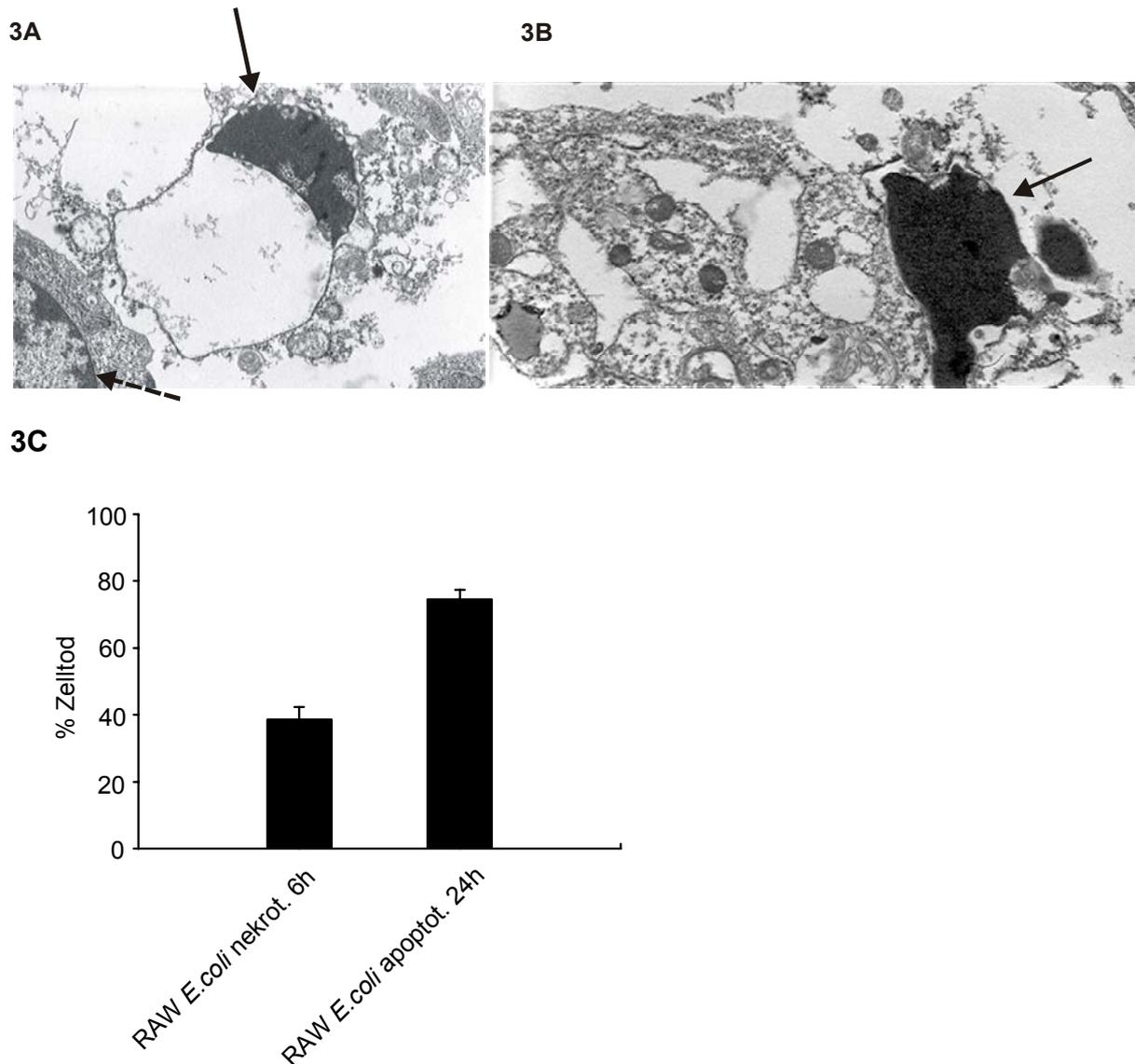


Abbildung 3: Apoptose und Nekrose in Makrophagen nach Koinkubation mit Bakterien

3A/B: RAW Zellen wurden für eine Stunde mit *E.coli* Bakterien koinkubiert und nach weiteren 24 Stunden elektronenmikroskopisch analysiert: Komplette Desintegration zweier RAW Zellen mit Verlust der Plasmamembran und gleichzeitig kondensiertem Chromatin im Zellkern (Pfeile). Dazu im Vergleich normale Chromatinstruktur einer angrenzenden intakten Zelle (gestrichelter Pfeil).

3C Je 5×10^5 RAW Zellen wurden für eine Stunde mit Bakterien koinkubiert. Nach 6 Stunden weiterer Kultivierung unter normalen Bedingungen wurde der Anteil der nekrotischen Zellen durch eine Eosin-Färbung, nach 24 Stunden die Apoptoserate durch eine Färbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 bestimmt. Licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt wurden pro Probe mindestens 300 Zellen, angegeben ist die Zelltodrate mit Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Proben.

Auffallend in diesem Zusammenhang sind Beobachtungen aus der Elektronenmikroskopie. Der Großteil der toten RAW Zellen hier zeichnet sich acht und 24 Stunden nach Behandlung mit *E.coli* Bakterien entweder durch

morphologische Merkmale apoptotischer oder nekrotischer Zellen aus. Doch sind hier auch Zellen zu finden, die weder dem einen noch dem anderen Zelltod zugewiesen werden können, da sie sowohl apoptotische als auch nekrotische Merkmale aufweisen (Abbildung 3A und 3B): Bei diesen Zellen ist die Plasmamembran eindeutig zerstört, Organellen und Zytoplasma treten aus. Doch neben diesem Hinweis auf einen nekrotischen Zelltod scheint die Morphologie des Kernes mehr zu der einer apoptotischen Zelle zu passen: Das Chromatin ist verdichtet und konzentriert sich am Rand des ursprünglichen Kerns. Eine derartige Zelle würde unserer Definition nach in beide Kategorien des Zelltodes passen. Ob dies primär nekrotische Zellen sind, die sekundär noch dem Prozess der Apoptose unterliegen, muss jedoch noch endgültig geklärt werden.

1.1.4 Apoptose, aber nicht Nekrose kann blockiert werden durch Caspaseninhibition oder Überexpression von Bcl-2

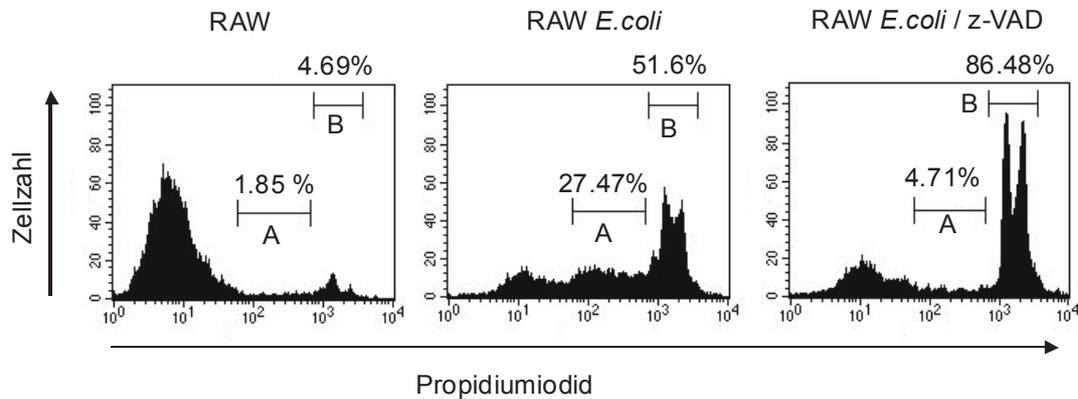
Methoden zur Blockade von Apoptose sind seit langer Zeit bekannt. Ob eine Verhinderung von Apoptose auch Einfluss auf den Zelltod durch Nekrose hat, haben wir experimentell in zwei Ansätzen untersucht:

Zum einem wurde der Caspaseninhibitor z-VAD.fmk verwendet, der an alle bekannten Caspasen bindet und deren Aktivität dadurch blockiert. Wie erwartet, konnte dadurch der Anteil der apoptotischen Zellen 22 Stunden nach Koinkubation mit *E.coli* Bakterien deutlich verringert werden: In einer Propidiumiodid-Färbung dieser Zellen erscheint der „subG1“-Peak der apoptotischen Zellen (links der nekrotischen Zellen, unter dem Marker A) in Anwesenheit von z-VAD.fmk stark reduziert (siehe Abbildung 4A). Auffallend ist, dass zwar Apoptose unter diesen Bedingungen effektiv blockiert werden kann, der Anteil der überhaupt Propidiumiodid aufnehmenden und somit toten Zellen sich aber keineswegs verringert: Hier scheinen mehr Zellen durch Nekrose zu sterben.

Da mitochondriale Prozesse der Apoptose im Signaltransduktionsweg proximal der Caspasenaktivierung stattfinden, können diese unter Verwendung von Caspaseninhibitoren nicht beeinflusst werden. Um auch diese mitochondrialen Veränderungen inhibieren zu können, wurden RAW Zellen verwendet, die das anti-apoptotische Protein Bcl-2 überexprimieren. Apoptose in diesen Zellen (bestimmt anhand der Kernmorphologie) erscheint 22 Stunden nach Behandlung mit Bakterien

fast komplett blockiert (siehe Abbildung 4B). Die Zellen werden jedoch als Hinweis auf trotzdem stattfindenden Zelltod effektiv von Phagozyten wie dendritischen Zellen aufgenommen (siehe Punkt 2.2.2, Abb.10D). Auch konnte ein Verlust der Integrität der Plasmamembran nachgewiesen werden (Hacker et al., 2002).

4A



4B

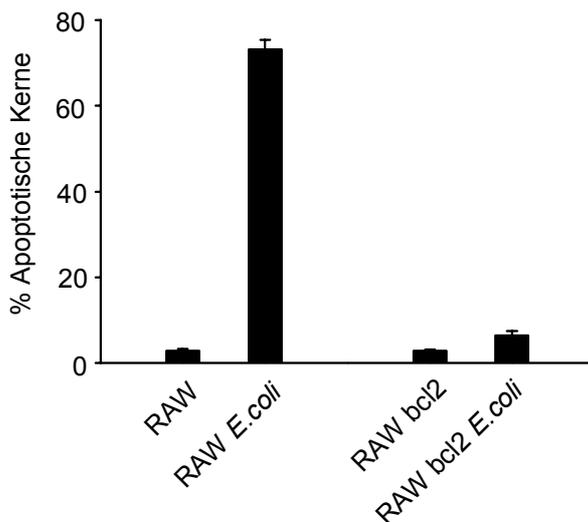


Abbildung 4: Nukleäre Apoptose, aber nicht der Verlust der Plasmamembran-Integrität kann durch Caspasen-Inhibition oder Überexpression von Bcl-2 blockiert werden

4A: RAW Zellen wurden mit einer Suspension aus *E.coli* Bakterien für eine Stunde koinkubiert. Die Bakterien wurden durch Waschen mit PBS entfernt, und die Zellen wurden für 22 Stunden in der An- oder Abwesenheit des Caspaseninhibitors z-VAD.fmk weiter kultiviert. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und ohne Fixierung durchflusszytometrisch analysiert: Apoptotische Zellen (Marker A, sub-G1-Peak) binden weniger Propidiumiodid als nekrotische Zellen rechts (Marker B). **4B:** RAW Zellen und Bcl-2 – überexprimierende RAW-Zellen wurden unbehandelt belassen oder für 1 Stunde mit *E.coli* Bakterien inkubiert und nach weiteren 22 Stunden mit dem Hoechst-Farbstoff angefärbt und nach ihrer Kernmorphologie unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert: Ausgezählt wurden pro Probe mindestens 300 Zellen, angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei gleich behandelten Proben.

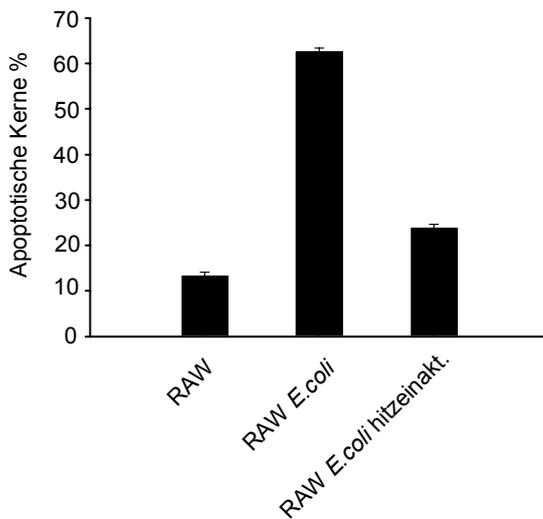
Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass der beobachtete nekrotische Zelltod in Makrophagen ein von der Apoptose unabhängiger Vorgang ist.

1.1.5 Durch hitzeinaktivierte *E.coli* Bakterien kann zwar Nekrose, aber nicht Apoptose in Makrophagen ausgelöst werden

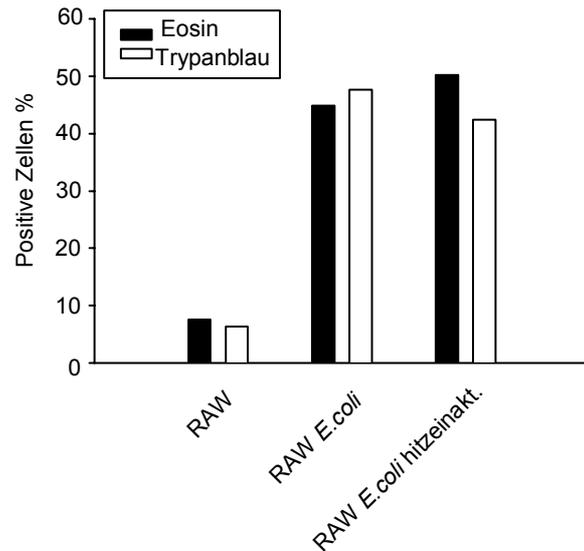
Durch Inkubation von *E.coli* Bakterien für 30 Minuten bei 65°C werden über 99% der Bakterien abgetötet. Diese hitzeinaktivierten Bakterien werden kaum noch von RAW Makrophagen aufgenommen, wahrscheinlich, weil bestimmte Oberflächenstrukturen der Zellen zerstört wurden (Hacker et al., 2002).

Inkubation von RAW Zellen mit hitzeinaktivierten Bakterien führt nicht mehr zur Auslösung von signifikanten Apoptoseraten nach 22 Stunden: Im Gegensatz zur Verwendung unbehandelter Bakterien ist die Apoptoserate stark vermindert (siehe Abbildung 5A und Hacker et al., 2002).

5A



5B



5C

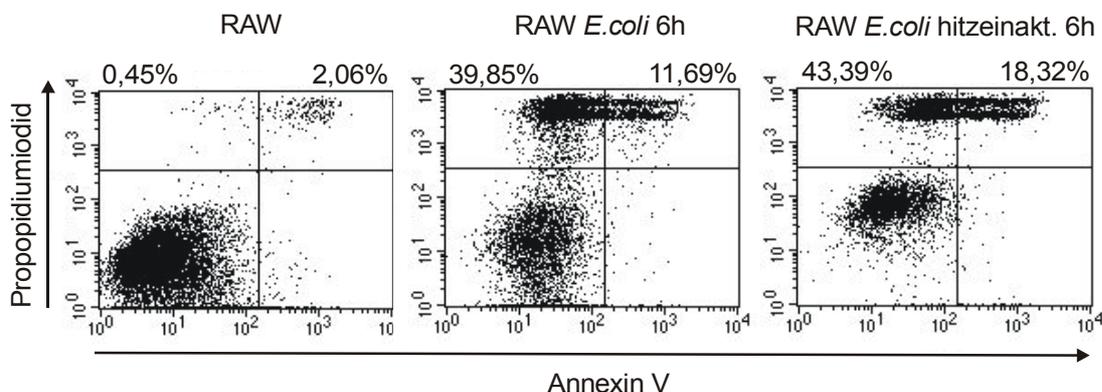


Abbildung 5: Hitzeinaktivierte Bakterien induzieren Nekrose, aber nicht Apoptose in RAW Makrophagen

RAW Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit normalen oder hitzeinaktivierten (bei 65°C für 30 Minuten) Bakterien für eine Stunde inkubiert. **5A:** 22 Stunden nach Koinkubation wurden die Zellen gesammelt, mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop nach ihrer Kernmorphologie ausgewertet. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben, in denen jeweils mindestens 300 Zellen ausgezählt wurden. **5B:** Sechs Stunden nach Bakterienkontakt wurden die Zellen gesammelt, die Integrität der Plasmamembran wurde durch die Farbstoffe Eosin und Trypanblau geprüft. Der Anteil der die jeweiligen Farbstoffe aufnehmenden Zellen an mindestens 300 ausgezählten Zellen ist dargestellt. **5C:** Sechs Stunden nach Koinkubation mit Bakterien wurden die RAW Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben sind die Prozentsätze der PI-positiven bzw. PI und Annexin-positiven Zellen.

Dies wirft die Frage auf, ob eine erfolgreiche Phagozytose von Bakterien auch notwendig für die Auslösung des Zelltods durch Nekrose ist. Bei der Untersuchung der Vitalität der Zellen in Hinsicht auf intakte Zellmembranen fanden sich hier jedoch sowohl bei unbehandelten als auch bei hitzeinaktivierten Bakterien sechs Stunden nach Bakterienkontakt vergleichbare Zelltodraten in Makrophagen (Abbildung 5B und 5C): Hitzeinaktivierung verändert also nicht die Potenz der Bakterien, in Makrophagen Nekrose zu induzieren.

Eine erfolgreiche Phagozytose von Bakterienbestandteilen scheint somit nicht Voraussetzung für den frühen Zelltod durch Nekrose zu sein.

1.1.6 Der nekrotische Zelltod in RAW Makrophagen nach Bakterienkontakt konnte mit butyliertem Hydroxyanisol nicht blockiert werden

Wie unter Punkt 1.1.4 beschrieben, ist es möglich, den Prozess der Nekrose in Makrophagen nach Bakterienkontakt zu isolieren, indem man die Apoptose blockiert. Ob auch der Zelltod durch Nekrose zuverlässig verhindert werden kann, ist derzeit nicht klar. Die Mechanismen, die zu Nekrose führen, sind bis heute nicht im Detail bekannt. Dennoch konnten in einzelnen Fällen chemische Substanzen identifiziert werden, mit deren Hilfe unter bestimmten Umständen Nekrose blockiert wird. Zu diesen Substanzen gehört butyliertes Hydroxyanisol (BHA), Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) und Glycin. Es wurde gezeigt, dass in Gegenwart von BHA sowohl TNF-induzierter (Yeh et al., 2000) als auch CD95-induzierter nekrotischer Zelltod erfolgreich blockiert werden konnte (Vercammen et al., 1998b). Auch PDTC schützte vor Caspasen-unabhängigem CD95-abhängigem Zelltod (Matsumura et al., 2000). Glycin, ein Ionen-Kanal-Blocker, blockierte erfolgreich Nekrose nach einem durch ATP-Entzug oder Hypoxie entstandenem Zellschaden (Dong et al., 1997; Frank et al., 2000).

Bei dem Versuch, den frühen nekrotischen Zelltod von Makrophagen nach Inkubation mit *E.coli* Bakterien durch BHA zu inhibieren, konnte keine Verringerung der Rate der Zellen mit nicht mehr intakter Membran sechs Stunden nach Bakterienkontakt beobachtet werden (siehe Abbildung 6). Auch der Einsatz von PDTC und Glycin führte nicht zu einer signifikanten Eindämmung der Nekroserate (Kirschnek et al., 2004).

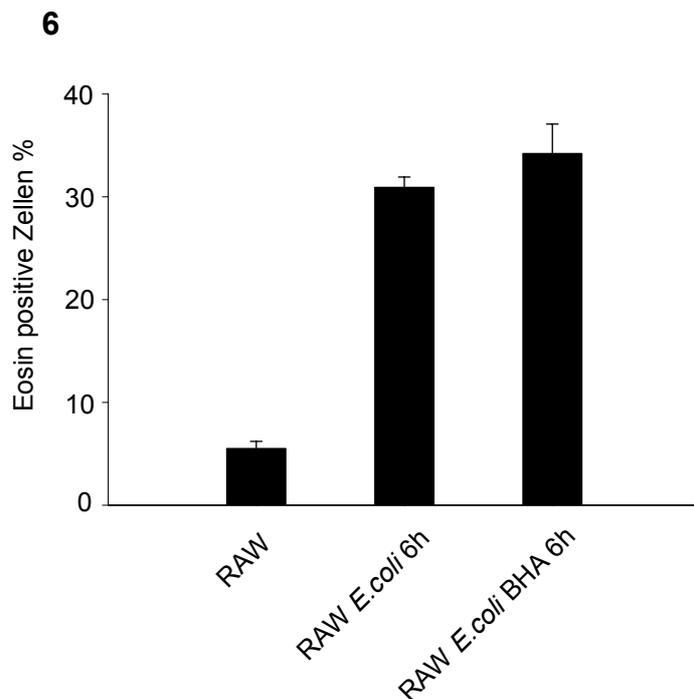


Abbildung 6: BHA bewirkt keine Blockierung des nekrotischen Zelltods

5×10^5 RAW Zellen wurden für eine Stunde mit Bakterien inkubiert, die Bakterien durch Waschen entfernt und die Zellen weiter in An- oder Abwesenheit von butyliertem Hydroxyanisol (BHA, $50\mu\text{M}$) kultiviert. Nach sechs Stunden wurde der Anteil der Zellen, die die Plasmamembran-Integrität verloren haben, durch Färbung mit Eosin bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben, in denen jeweils mindestens 300 Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt wurden.

1.2 Zelltod nach Infektion mit dem Vaccinia-Virus MVA

Verschiedene Viren können der gegen sie gerichteten Immunantwort des Wirtes entgehen. Dies geschieht zum Beispiel durch Verhinderung von Apoptose in Wirtszellen, durch die virusinfizierte Zellen aus dem Organismus eliminiert werden sollen. Ein Beispiel für ein Virus mit derartigen Fähigkeiten ist das Vaccinia Virus MVA (modified vaccinia virus Ankara), Mitglied der Familie der Pockenviren: Hier scheint ein als F1L bezeichnetes Protein an der Inhibition von Apoptose beteiligt zu sein (Wasilenko ST, Proc Natl Acad Sci USA, 2003). Bei Ausschaltung des Gens, das für dieses Protein kodiert, wird Apoptose induziert. Die antiapoptotische Wirkung

von F1L vollstreckt sich dabei wahrscheinlich auf mitochondrialer Ebene: Neueste Ergebnisse weisen hier auf eine Interaktion mit BH3-Domänen enthaltenden proapoptotischen Proteinen hin (Fischer SF et al., Cell Death and Differentiation 2005, epub July 89).

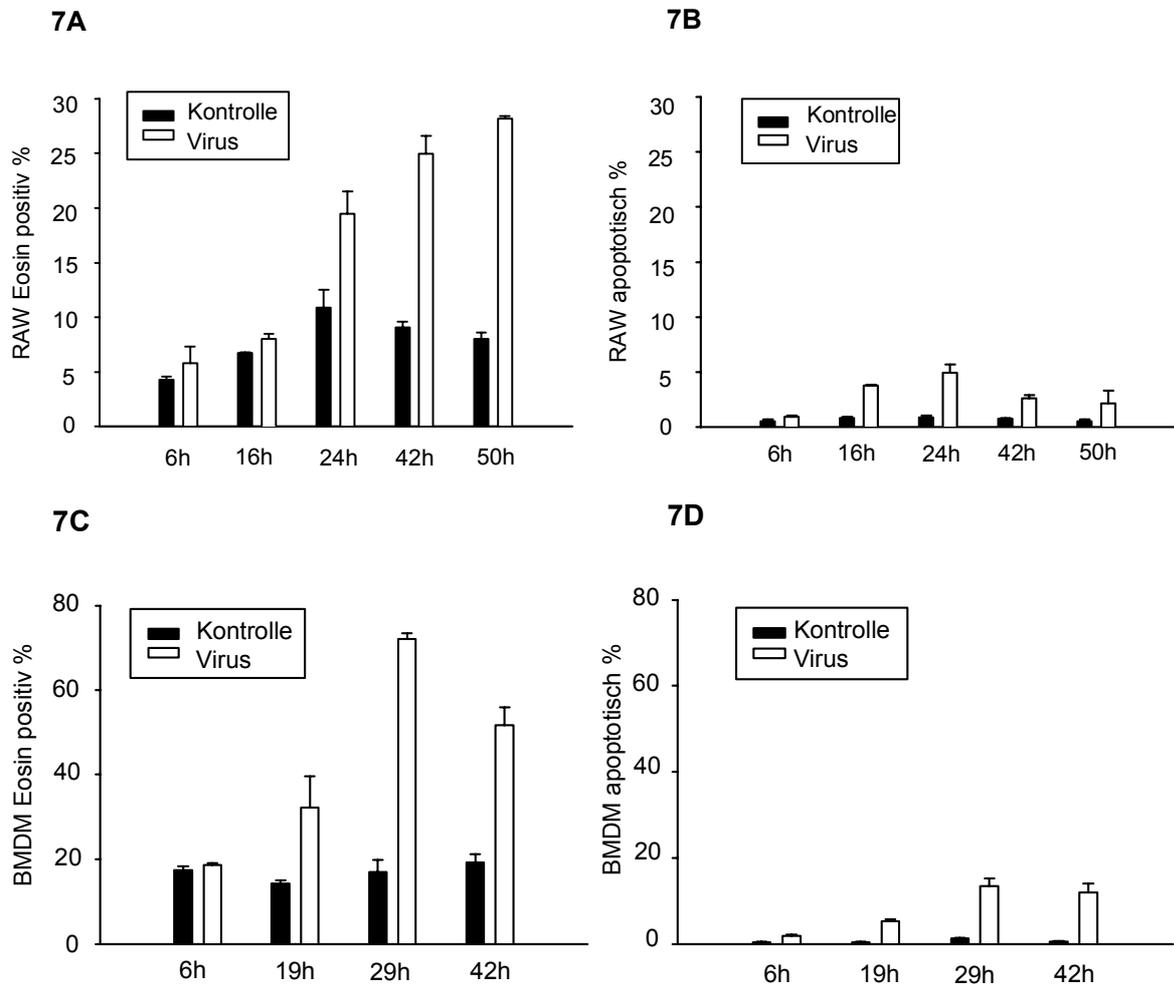


Abbildung 7: MVA-Vaccinia-Viren induzieren Nekrose in RAW264.7 Zellen und primären Knochenmarksmakrophagen

$1,5 \times 10^6$ RAW Zellen (**7A/B**) oder primäre Knochenmarksmakrophagen (**7C/D**) wurden unbehandelt belassen (Kontrolle) oder mit MVA-Vaccinia-Viren in einem Zell-zu-Virus - Verhältnis von 1:5 während eines Zeitraums von 1,5 Stunden infiziert. Die Zellen wurden dann gewaschen und weiter unter normalen Bedingungen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gesammelt und mit dem Vitalfarbstoff Eosin zur Überprüfung auf eine Unversehrtheit der Plasmamembran gefärbt (**7A/C**). Zur gleichen Zeit erfolgte eine Färbung mit dem Hoechst-Farbstoff zur Bestimmung der Apoptoserate (**7B/D**). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben, in denen jeweils mindestens 300 Zellen licht- bzw. fluoreszenz-mikroskopisch ausgezählt wurden.

In unserem bakteriellen Infektionsmodell beobachten wir Apoptose und Nekrose in Makrophagen nach Aufnahme niedrig pathogener *E.coli* Bakterien. In den bisherigen Experimenten wurde unter künstlichen in vitro Bedingungen durch Caspaseninhibition und Überexpression von Bcl-2 Apoptose inhibiert, trotzdem trat

der Zelltod durch Nekrose auf. Wir haben nun dieses Infektionsmodell des Vaccinia-Virus gewählt, um zu überprüfen, ob in diesem System, in dem auf „natürliche“ Weise Apoptose inhibiert wird, trotzdem Zelltod durch Nekrose stattfindet.

Zu diesem Zweck wurden sowohl RAW Makrophagen (Abbildung 7A/7B) als auch primäre Makrophagen (hergestellt aus dem Knochenmark von Mäusen, Abbildung 7C/7D) für 1,5 Stunden mit dem MVA Vaccinia Virus koinkubiert und die Zellen dann nach einem Waschschrift weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde sie sowohl auf Integrität der Zellmembran als Hinweis auf Zelltod (Abbildung 7A/7C) als auch auf Apoptose anhand der Kernmorphologie (Abbildung 7C/7D) untersucht. Hierbei fällt auf, dass die Apoptoseraten nach Infektion mit dem Virus wie erwartet sehr gering bleiben, die Zellen jedoch trotzdem Vitalfarbstoffe aufnehmen: Inhibition der Apoptose scheint also nicht den Zelltod an sich verhindern zu können.

2. Aufnahme toter Makrophagen durch phagozytierende Zellen

2.1 Dendritische Zellen können effektiv tote Zellen in ihrer Umgebung aufnehmen

Tote Zellen werden in vivo schnell und effektiv von Phagozyten aufgenommen. Gut erforscht ist der Mechanismus der Aufnahme von Zellen, die durch Apoptose sterben. Eine Reihe von Oberflächenveränderungen auf den zugrunde gehenden Zellen und die zugehörigen Rezeptoren sind hier bekannt (siehe Einleitung Punkt 2.1). Doch auch nekrotische Zellen scheinen erfolgreich aufgenommen und beseitigt werden zu können. Einzelheiten über Mechanismen, Zeitpunkt und Effektivität der Aufnahme sind jedoch noch unklar. Auch wurde Nekrose in den meisten veröffentlichten Modellen durch „unphysiologische“ Methoden wie zum Beispiel mehrfaches Gefriertauen einer Zellsuspension erreicht. In unserem System jedoch tritt Nekrose (neben Apoptose) unter „natürlichen“ Bedingungen, nämlich während einer bakteriellen Infektion, auf. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Prozesse der Nekrose von denen der Apoptose zu trennen oder ein nebeneinander beider Arten des Zelltodes zuzulassen und dabei Auswirkungen auf die Effizienz der Aufnahme zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde sowohl in RAW Makrophagen als auch in primären Makrophagen unter entsprechenden Bedingungen Apoptose beziehungsweise Nekrose induziert, die Zellen wurden daraufhin mit Phagozyten

koinkubiert. Als phagozytierende Zellen wurden sowohl dendritische Zellen (die Maus DC Linie D2SC/1 und primäre DC hergestellt aus dem Knochenmark von Mäusen) als auch Makrophagen (die Mausmakrophagenzelllinien RAW 264.7 und J774) verwendet.

Um die Aufnahme der toten Zellen verfolgen zu können, wurden beide Zelltypen vor Zelltodinduktion und Koinkubation mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, und die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde der Anteil der doppelt positiven Zellen bestimmt: Diese Zellen, die beide Farbstoffe enthalten, stellen (lebende) Phagozyten dar, die totes umliegendes Material (angefärbt mit dem anderen Farbstoff) aufgenommen haben.

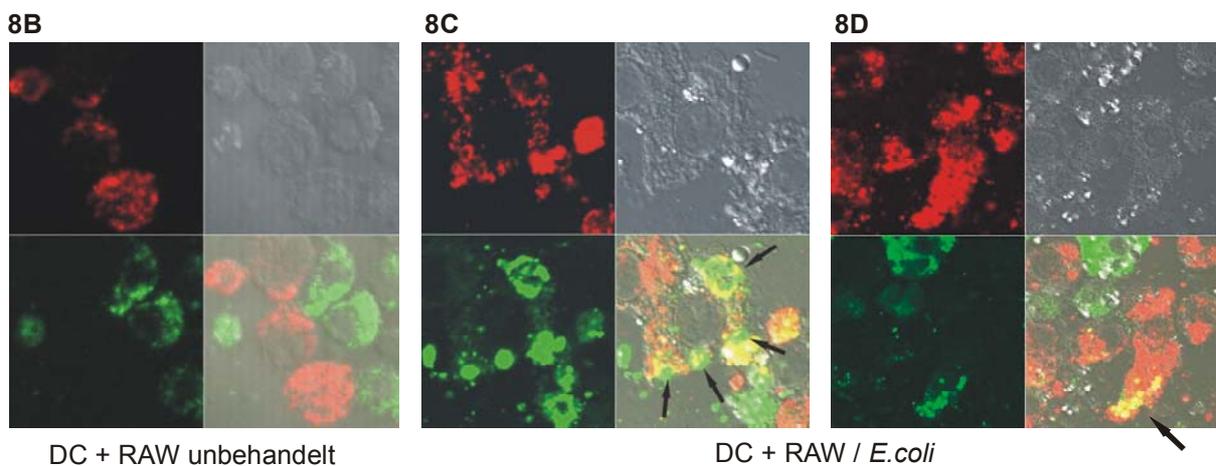
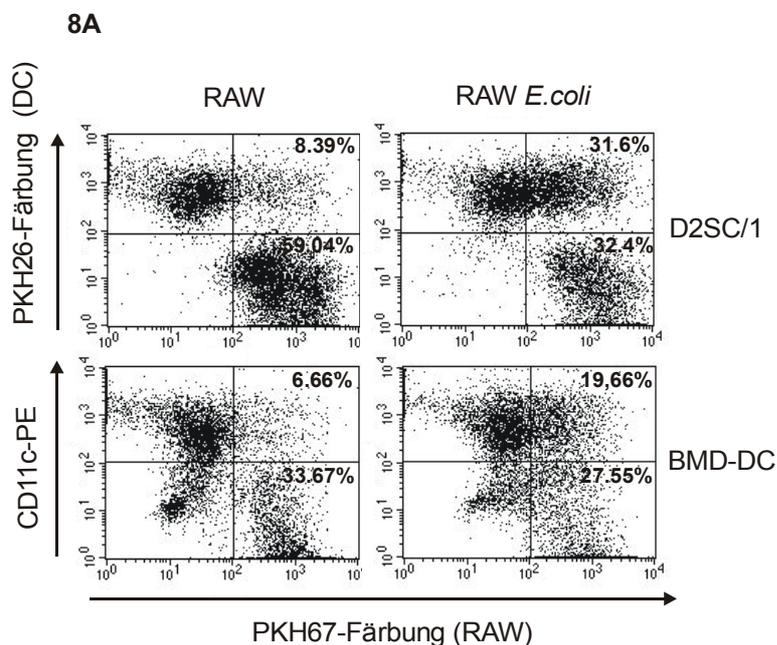


Abbildung 8: Aufnahme von mit *E.coli* Bakterien behandelten RAW264.7 Zellen durch dendritische Zellen

8A: RAW Zellen wurden grün gefärbt (PKH67) und entweder unbehandelt belassen oder mit *E.coli* Bakterien inkubiert. Obere Bilder: Nach 22 Stunden wurden 5×10^5 RAW Zellen zu einer Kultur rot gefärbter (PKH26) dendritischer Zellen ($2,5 \times 10^5$) der Zelllinie D2SC/1 hinzugefügt und für zwei Stunden koinkubiert. Die Zellen wurden fixiert und per Durchflusszytometrie analysiert. Untere Bilder:

Nach 22 Stunden wurden die RAW Zellen (5×10^5) zu primären Knochenmarks- dendritischen Zellen ($2,5 \times 10^5$) in 12-Loch-Platten hinzugefügt. Nach zwei Stunden Koinkubation wurden die Kulturen mit anti-CD11c-PE gefärbt, um die dendritischen Zellen zu identifizieren, dann fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. **8B/C/D**: Konfokale Mikroskopie: Mit dem Farbstoff PKH67 grün gefärbte RAW Zellen wurden unbehandelt belassen (8B) oder für eine Stunde mit *E.coli* Bakterien koinkubiert (8C/D), auf „coverslips“ ausgesät und unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach 24 Stunden wurden rot gefärbte (PKH26) D2SC/1 Zellen hinzugefügt. Nach zwei Stunden Koinkubation wurden die Zellen fixiert und unter einem konfokalen Mikroskop photographiert. Die schwarzen Pfeile weisen auf grünes Material von grünen toten RAW Zellen innerhalb zweier dendritischer Zellen.

Wurden unbehandelte RAW Zellen für zwei Stunden mit dendritischen Zellen koinkubiert, wurde eine nur geringe Zahl an doppelt positiven Signalen beobachtet. Wenn die RAW Makrophagen dagegen 22 Stunden nach Exposition zu *E.coli* Bakterien mit den dendritischen Phagozyten kokultiviert wurden, stieg die Zahl der doppelt positiven Zellen stark an: Die dendritischen Zellen (sowohl die Zelllinie D2SC/1 als auch primäre DC) hatten erfolgreich während der zweistündigen Koinkubation tote Makrophagen aufgenommen (Abbildung 8A).

Dieses Ergebnis konnte auch bei Beobachtung der koinkubierten Zellen unter dem konfokalen Mikroskop bestätigt werden: Während unbehandelte grüne RAW Makrophagen Seite an Seite zu roten D2SC/1 dendritischen Zellen liegen (Abbildung 8B), finden sich nach Koinkubation mit toten RAW Zellen nach Bakterienexposition grüne Partikel dieser Zellen im Zytoplasma der roten intakten dendritischen Zellen (Abbildung 8C/8D).

2.1.1 Aufnahme apoptotischer Zellen

Die Population gemischt apoptotisch-nekrotischer Zellen wird somit erfolgreich von dendritischen Zellen aufgenommen. Während wir in unserem experimentellen System Apoptose nach Bakterienkontakt effektiv inhibieren können (siehe Punkt 1.1.4) und den nekrotischen Zelltod somit isoliert betrachten können, gelang bis jetzt keine Blockade der Nekrose (siehe Punkt 1.1.6). Wir haben deswegen die apoptoseauslösende Funktion von UV-Strahlung genutzt, um auch eine Population (annähernd) rein apoptotischer Zellen zu erzeugen und die Aufnahme dieser Zellen durch Phagozyten untersuchen zu können.

RAW Zellen wurden in proteinfreiem Medium bestrahlt und für die angegebenen Zeiträume weiter unter normalen Bedingungen kultiviert. Dann wurden die jeweiligen Apoptoseraten unter Auswertung der Kernmorphologie in einer Hoechst-Färbung bestimmt: Bereits nach 12 Stunden konnten dabei über 80% apoptotische Zellen

beobachtet werden (Abbildung 9A). Bei Koinkubation der bestrahlten RAW Makrophagen mit D2SC/1 dendritischen Zellen war eine zunehmend bessere Aufnahme der toten Zellen im Zeitverlauf zu sehen: Die steigende Zahl der apoptotischen Makrophagen wurde rasch von den dendritischen Zellen während der zweistündigen Koinkubation phagozytiert (Abbildung 9B).

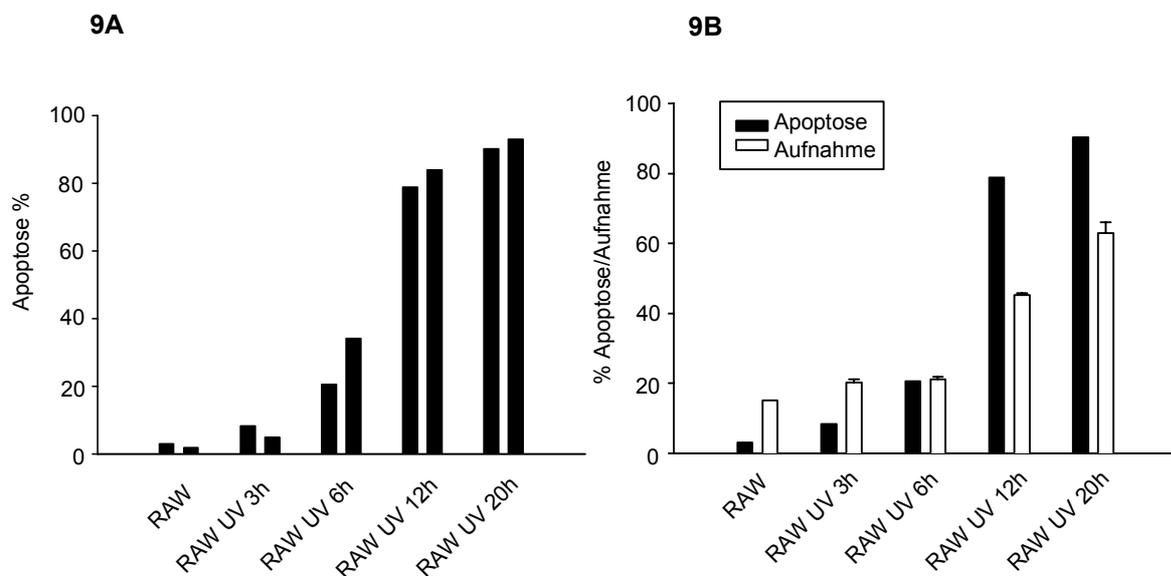


Abbildung 9: Aufnahme UV-bestrahlter apoptotischer RAW Zellen durch dendritische Zellen

RAW Zellen wurden grün gefärbt (PKH67) und unter serumfreien Bedingungen eine Minute einer UV-Strahlung ausgesetzt ($\sim 1600 \text{ J/m}^2$). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung wurde der Anteil der apoptotischen Kerne durch Hoechst-Färbung und lichtmikroskopische Auswertung bestimmt (9A und 9B schwarze Balken). Mindestens 300 Zellen pro Probe wurden ausgezählt. Die Daten der Doppelbalken stammen aus zwei verschiedenen Experimenten. 9B: Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die grün gefärbten RAW Zellen mit rot gefärbten (PKH26) D2SC/1 Zellen für zwei Stunden koinkubiert, fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben (weiße Balken) ist der Prozentsatz der D2SC/1 Zellen, die grünes Material aus toten RAW Zellen enthalten, als Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben. Die Ergebnisse sind angegeben als Prozentsatz der aufgenommenen RAW Zellen (weiße Balken): Dieser wurde berechnet als Anteil der PKH67/PKH26 doppelt positiven Zellen an allen PKH67 positiven (also RAW) Zellen (Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

2.1.2 Aufnahme nekrotischer Zellen

Wie bereits unter Punkt 1.1.1 und 1.1.2 ausgeführt, stirbt ein Großteil von Makrophagen in den ersten sechs bis acht Stunden nach Koinkubation mit *E.coli* Bakterien durch Nekrose, erst zu späteren Zeitpunkten tritt auch Zelltod in Form von Apoptose auf (Abbildung 10A, schwarze Balken). Wurden die so behandelten RAW Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten mit dendritischen Zellen koinkubiert, wurden sie bereits sechs bis acht Stunden nach Bakterienkontakt deutlich von den dendritischen Zellen aufgenommen: Die zu diesen Zeitpunkten vorhandenen nekrotischen Zellen

werden somit erfolgreich und schnell beseitigt. Auffallend ist auch, dass sich das Ausmaß der aufgenommenen Zellen bei einer längeren Wartezeit nach Bakterienexposition nicht mehr signifikant steigern lässt: Die Aufnahme der nekrotischen Zellpopulation acht Stunden nach Koinkubation mit Bakterien ist ähnlich effektiv wie die der gemischt nekrotisch-apoptotischen Zellen nach 22 Stunden (Abbildung 10A, weiße Balken). Eine ähnlich gute Aufnahme konnte bei Verwendung nekrotischer primärer Makrophagen (hergestellt aus dem Knochenmark von Mäusen) nach Bakterienkontakt festgestellt werden (Abbildung 10B).

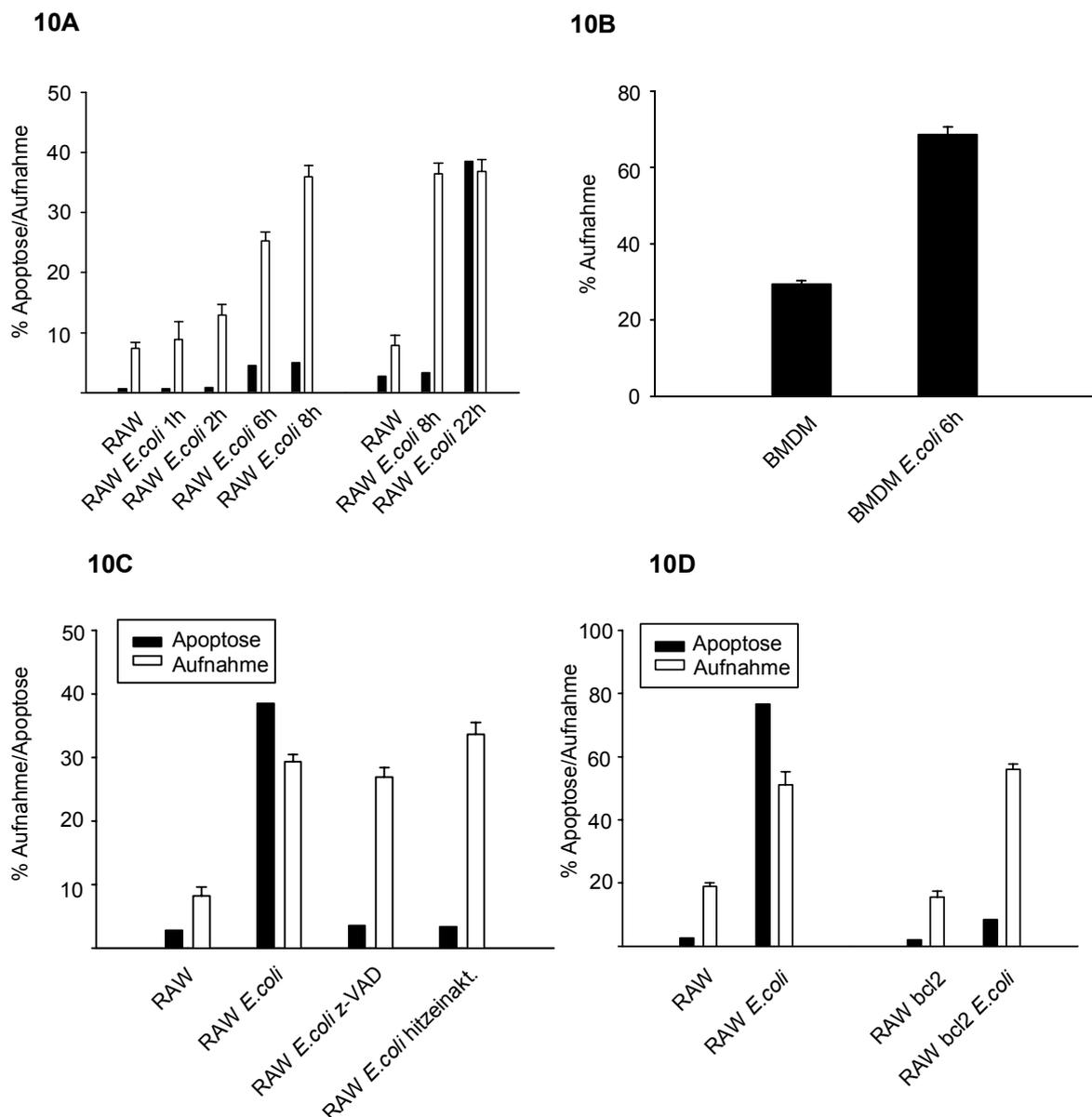


Abbildung 10: Nekrose ist ausreichend für die Aufnahme von RAW Zellen durch dendritische Zellen.

10A: Apoptose und Aufnahme im Zeitverlauf. Mit PKH67 gefärbte RAW Zellen wurden für eine Stunde mit *E.coli* Bakterien inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bakterienkontakt mit dem Hoechst-Farbstoff gefärbt. Der Anteil der apoptotischen Kerne wurde bestimmt (schwarze Balken). Zur gleichen Zeit wurden die RAW Zellen gesammelt und mit einer Kultur PKH26 gefärbter D2SC/1 Zellen für zwei Stunden koinkubiert. Nach Fixation wurde die Aufnahme durchflusszytometrisch analysiert

(weiße Balken). Die Ergebnisse sind angegeben als Prozentsatz der aufgenommenen RAW Zellen: Dieser wurde berechnet als Anteil der PKH67/PKH26 doppelt positiven Zellen an allen PKH67 positiven (also RAW) Zellen (Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben). **10B:** Aufnahme primärer Makrophagen: Primäre PKH67 gefärbte Knochenmarksmakrophagen (BMDM) wurden unbehandelt belassen oder wie oben mit *E.coli* inkubiert und nach sechs Stunden mit PKH26 gefärbten D2SC/1 Zellen für zwei Stunden kokultiviert. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch analysierte Aufnahme der Makrophagen nach Fixation, Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben. **10C:** RAW Zellen gefärbt mit dem Farbstoff PKH67 wurden mit normalen oder hitzebehandelten Bakterien inkubiert. Nach Bakterienkontakt wurden sie in An- oder Abwesenheit des Caspaseninhibitors z-VAD.fmk kultiviert. Nach 22 Stunden wurde die Apoptoserate durch Auszählen der Kernmorphologie bestimmt (schwarze Balken), zur Analyse der Aufnahme wurden die Zellen wie oben mit D2SC/1 Zellen kokultiviert und analysiert (weiße Balken, Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachwerten). **10D:** Bcl-2 verhindert Bakterien-induzierte Apoptose aber nicht die Aufnahme durch DC. Normale oder Bcl-2 überexprimierende RAW Zellen wurden mit PKH67 gefärbt und unbehandelt gelassen oder mit Bakterien inkubiert. Nach 22 Stunden wurde der Anteil der apoptotischen Kerne fluoreszenzmikroskopisch nach Hoechst-Färbung bestimmt (schwarze Balken), die Zellen wurden wie oben für zwei Stunden mit PKH26 gefärbten D2SC/1 Zellen kokultiviert, fixiert und durchflusszytometrisch analysiert (Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachwerten, weiße Balken).

Auch unter anderen Nekrose-induzierenden Bedingungen wurde die Aufnahme dieser Zellen untersucht. So wurde zum einen die durch *E.coli* Bakterien ausgelöste Apoptose durch Verwendung des Caspaseninhibitors z-VAD.fmk blockiert. Zum anderen wurden hitzeinaktivierte Bakterien zur Koinkubation verwendet. In beiden Fällen sind die auftretenden Apoptoseraten sehr gering, der Zelltod durch Nekrose findet jedoch unverändert statt. Die so behandelten nekrotischen Zellen wurden effektiv von dendritischen Zellen aufgenommen (Abbildung 10C).

Auch Bcl-2 exprimierende RAW-Zellen, in denen die Apoptoserate nach Exposition zu Bakterien im Vergleich zu normalen RAW Zellen stark verringert ist (siehe Abbildung 4B und Abbildung 10D, schwarze Balken), wurden wegen des trotzdem stattfindenden nekrotischen Zelltods von dendritischen Zellen phagozytiert (Abbildung 10D, weiße Balken).

Das gleiche gilt für RAW Makrophagen, die mit dem MVA Vacciniavirus infiziert wurden: Diese Zellen, in denen zwar Apoptose blockiert ist, nekrotischer Zelltod aber trotzdem stattfindet (siehe Punkt 1.2), werden von dendritischen Zellen aufgenommen (Abbildung 11).

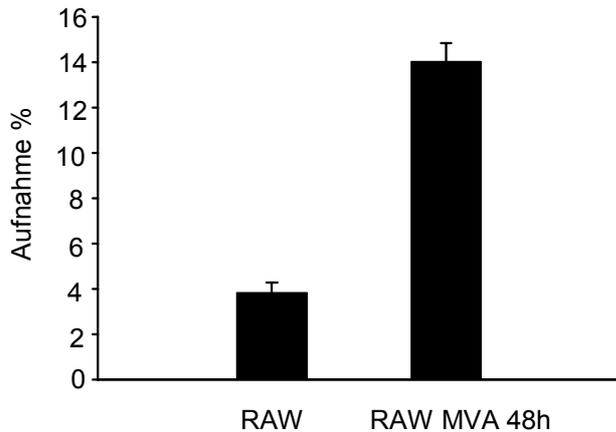


Abbildung 11: Nekrotische Zellen nach Infektion mit MVA-Vaccinia-Viren werden von dendritischen Zellen aufgenommen

PKH67-gefärbte RAW Zellen wurden für 1,5 Stunden in einem Zell-zu-Virus – Verhältnis von 1:5 mit MVA-Vaccinia-Viren infiziert, gewaschen und nach 48 Stunden mit PKH26 gefärbten D2SC/1 Zellen für zwei Stunden kokultiviert. Die Zellen wurden dann fixiert und der Anteil der aufgenommenen RAW Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

Der Zelltod durch Nekrose scheint somit ausreichend für eine effektive und schnelle Beseitigung dieser Zellen zu sein.

2.1.3 MAP-Kinase- und Proteasom-Inhibitoren haben Einfluss auf die Apoptoseraten in *E.coli* behandelten Makrophagen, jedoch nicht auf deren Aufnahme durch dendritische Zellen

MAP Kinasen wie die Familie der p38 Kinasen, spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung einer Immunantwort, da sie unter anderem an der Expression von inflammatorischen Zytokinen beteiligt sind (Johnson and Lapadat, 2002). Doch scheint p38 auch am Prozess der Apoptose beteiligt zu sein, dies konnte zum Beispiel nach Ligation von Fas beobachtet werden (Henkart, 1996; Xia et al., 1995). Abhängig von Zelltyp und Stimulus kann p38 jedoch wohl auch zum Überleben und Wachstum von Zellen beitragen (Zarubin and Han, 2005). Eine weitere für die Aktivierung von Zellen wichtige Gruppe von Kinasen, ist die Phosphoinositol-3 Kinasen- (PI3K) Familie. Produkte dieser Kinasen spielen nicht nur eine Rolle in der Expression von Genen für Zytokine, Überleben von Zellen durch Apoptoseinhibition und für Proliferation, sondern sind auch wichtig für das Formen von Phagosomen und Aktivierung von Zellen über Toll-like Rezeptoren (Koyasu, 2003).

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Protease Komplex, der für intrazellulären nicht-lysosomalen Protein-Abbau verantwortlich ist. Das Proteasom nimmt eine zentrale Rolle in der Aktivierung des NF- κ B –Transduktionswegs ein. NF- κ B, ein induzierbarer Transkriptionsfaktor aus der Rel Familie, ist wichtig für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort und beteiligt an der Regulation von Apoptose und Zellproliferation (Karin and Lin, 2002).

Durch Behandlung von RAW Makrophagen mit *E.coli* Bakterien in Gegenwart der Inhibitoren der p38 MAP Kinase (SB 203580), der PI3 Kinasen (Wortmannin) oder des Proteasoms (Lactacystin) wurde ein Einfluss dieser inhibierten Stimulation auf die Apoptoseraten in den so behandelten Zellen und auf die nachfolgende Aufnahme der Makrophagen durch dendritische Zellen untersucht. Die Zellen wurden dabei sowohl während der einstündigen Koinkubation mit Bakterien als auch während der folgenden Kultivierung in Gegenwart der jeweiligen Inhibitoren inkubiert.

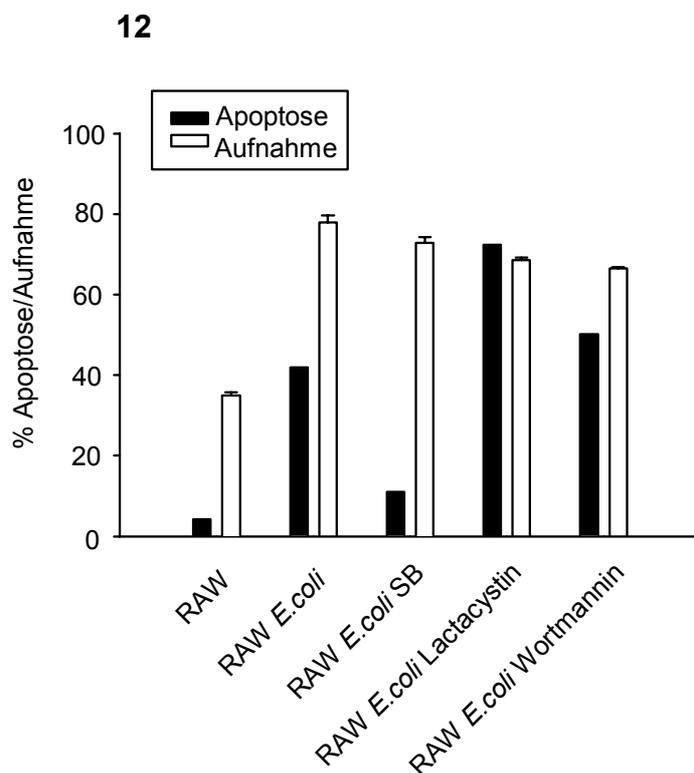


Abbildung 12: Der Anteil der Apoptose am Gesamtzelltod in RAW Zellen hat keinen wesentlichen Effekt auf das Ausmaß der Aufnahme durch dendritische Zellen

Mit PKH67 gefärbte RAW264.7 Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit einer Suspension *E.coli* Bakterien in Anwesenheit von SB 203580 (10 μ M), Lactacystin (5 μ M) oder Wortmannin (0,1 μ M) koinkubiert. Nach einer Stunde wurden die Bakterien gewaschen, die Zellen wurden in Anwesenheit der Inhibitoren für weitere 22 Stunden kultiviert. Dann wurde der Anteil der apoptotischen Zellen anhand ihrer Kernmorphologie nach Hoechst-Färbung bestimmt (schwarze Balken, Auszählung von mind. 300 Zellen), und die RAW Zellen wurden mit PKH26 gefärbten D2SC/1 Zellen für zwei Stunden koinkubiert. Nach Fixierung erfolgte die Analyse der Aufnahme der RAW Zellen per Durchflusszytometrie (weiße Balken, Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben)

Bei der Beobachtung der Apoptoseraten 22 Stunden nach Exposition zu Bakterien fällt auf, dass in Gegenwart des p38 Kinaseninhibitors SB 203580 (SB) der Anteil der apoptotischen Zellen deutlich reduziert ist. Während die Inhibition der PI3 Kinasen keine signifikante Auswirkung auf den Anteil der apoptotischen Zellen hat, scheint die Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin zu einer Steigerung der Apoptose zu führen (Abbildung 12, schwarze Balken).

Die so behandelten Zellen wurden für zwei Stunden (jetzt in Abwesenheit der jeweiligen Inhibitoren) mit dendritischen Zellen koinkubiert, und die Aufnahme der toten Makrophagen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei fällt auf, dass trotz der so verschiedenen Apoptoseraten die Aufnahme aller RAW Zellen annähernd gleich effektiv ist (Abbildung 12, weiße Balken): Das Ausmaß des Anteils der Apoptose am gesamten Zelltod scheint somit keine wesentliche Rolle in der Effektivität der Beseitigung durch dendritische Zellen zu spielen.

2.1.4 Werden Makrophagen vor Zelltodinduktion aktiviert, ändert dies nicht die Apoptoseraten beziehungsweise das Aufnahmeverhalten durch dendritische Zellen

Während der Inkubation von Makrophagen mit *E.coli* Bakterien werden die phagozytierenden Zellen zum einen durch bakterielle Bestandteile aktiviert, zum anderen führt dies zur Zelltodauslösung durch Apoptose und Nekrose. Dabei stellt sich die Frage, ob die Aktivierung der Zellen auch eine Auswirkung auf das Ausmaß des Zelltods hat. Andere Gruppen konnten zeigen, dass durch bakterielle Produkte wie LPS (Albina et al., 1993; Lakics and Vogel, 1998) und bakterielle Lipopeptide (Aliprantis et al., 1999) Apoptose ausgelöst werden kann.

Wir haben zwei verschiedene Modelle gewählt, um die Prozesse der Aktivierung und Zelltodauslösung in vitro nachahmen zu können:

So wurden die Zellen durch LPS stimuliert, und nachfolgend wurde durch Staurosporin, einen Proteinkinaseinhibitor, Apoptose induziert. Hierbei fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Zahl apoptotischer Zellen zwischen unbehandelten und mit LPS stimulierten beziehungsweise zwischen nur mit Staurosporin oder LPS plus Staurosporin behandelten RAW Makrophagen (Abbildung 13, schwarze Balken). Auch die Aufnahme der so behandelten Zellen

durch dendritische Zellen differierte nicht wesentlich (Abbildung 13, weiße Balken): Voraktivierung apoptotischer Zellen veränderte nicht das Aufnahmeverhalten durch die dendritischen Zellen.

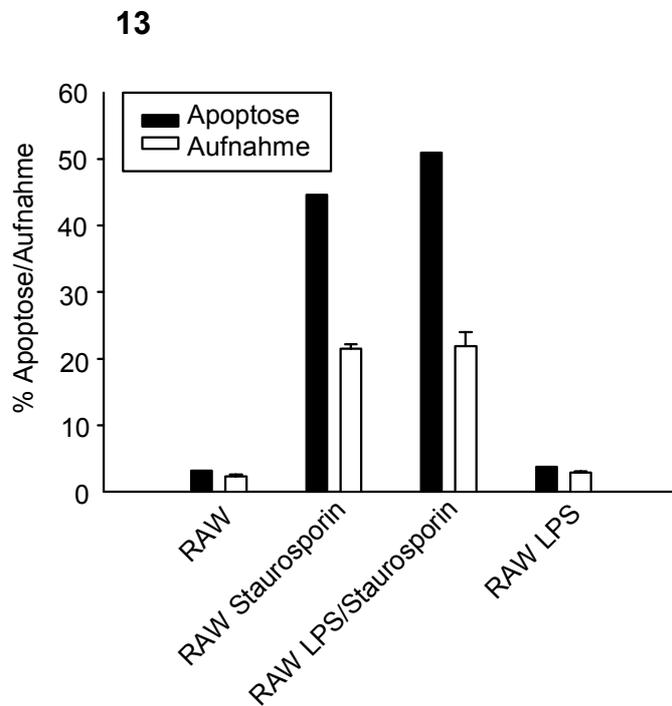


Abbildung 13: Aktivierung von RAW Zellen durch LPS vor Zelltodinduktion mit Staurosporin verändert nicht das Aufnahmeverhalten durch D2SC/1 Zellen

Grün (PKH67) gefärbte RAW Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit LPS (1µg/ml) für zwei Stunden stimuliert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen weiter für 20 Stunden in An- oder Abwesenheit von Staurosporin (1µM) zur Apoptoseinduktion kultiviert. Dann wurde der Anteil der apoptotischen Zellen kernmorphologisch bestimmt (schwarze Balken), und die RAW Zellen wurden mit rot (PKH26) gefärbten D2SC/1 Zellen für zwei Stunden kokultiviert und fixiert. Die Aufnahme wurde durchflusszytometrisch gemessen (weiße Balken, Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

Eine weitere Möglichkeit, Aktivierung und Apoptoseinduktion zu trennen und gleichzeitig eine Aktivierung in Abwesenheit von PAMPs, das heißt Bestandteile von Pathogenen, die Zellen über den TLR-Weg aktivieren, zu erreichen, stellt die Zelllinie RAW K14 dar. Diese RAW Makrophagen exprimieren ein Fusionskonstrukt aus MyD88 und *E.coli* Gyrase B. Zugabe von Coumermycin führt zu einer Dimerisierung von Gyrase B. Dadurch wird das an die Gyrase gekoppelte MyD88 dimerisiert, wie es auch bei einer Aktivierung von Toll like Rezeptoren geschieht. Dies führt in den Zellen zu den bekannten Folgen einer Toll like Rezeptor – Aktivierung: Es kommt unter anderem zu Kinasenaktivierung, NF-κB-Aktivierung und Sekretion von IL12 und TNF (Häcker et al., unveröffentlicht). Die Zellen werden dadurch auf „sterile Art“ aktiviert, da Coumermycin auf andere nicht transfizierte Zellen keinen Einfluss hat.

Dies ist wichtig, wenn aktivierte RAW K14 Makrophagen mit dendritischen Zellen koinkubiert werden.

Diese RAW K14 Zellen können somit durch Coumermycin aktiviert werden, bevor in ihnen durch UV-Bestrahlung Apoptose ausgelöst wird. Reine Aktivierung erhöht in der Zellpopulation nicht den Anteil apoptotischer Zellen. Auch lässt sich kein Unterschied in den Apoptoseraten nur bestrahlter beziehungsweise vor Bestrahlung aktivierter RAW Zellen feststellen (Abbildung 14A und 14B schwarze Balken). Werden diese Zellen mit dendritischen Zellen für zwei Stunden kokultiviert, ergeben sich durch die Voraktivierung keine Unterschiede in der Effektivität der Phagozytose der toten Zellen (Abbildung 14B, weiße Balken).

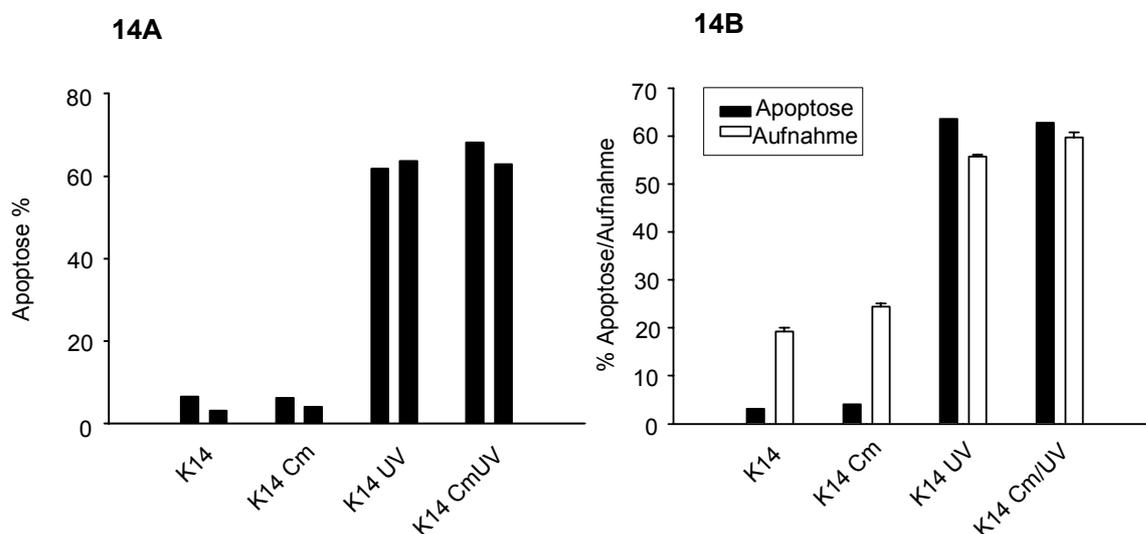


Abbildung 14: Aktivierung von TLR in RAW264.7 Zellen verändert nicht die Apoptoserate nach UV-Bestrahlung oder das Aufnahmeverhalten von D2SC/1 Zellen

Mit PKH67 gefärbte RAWK14 Zellen wurden unbehandelt belassen oder in Anwesenheit von Coumermycin ($1\mu\text{M}$) für 8 Stunden stimuliert. Ein Teil wurde dann unter serumfreien Bedingungen UV-bestrahlt (Dosis $\sim 1600\text{J}/\text{m}^2$), und die Zellen wurden weiter unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach 16 Stunden wurde die Apoptoserate anhand der Kernmorphologie nach Hoechst-Färbung ausgezählt (14A und 14B schwarze Balken, mindestens 300 gezählte Zellen/Probe). Die RAW Zellen wurden mit PKH26 gefärbten D2SC/1 Zellen für zwei Stunden koinkubiert, dann fixiert, und der Anteil der aufgenommenen RAW Zellen wurde per Durchflusszytometrie bestimmt (14B, weiße Balken, Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

2.2 Makrophagen phagozytieren tote umliegende Zellen

Nicht nur dendritische Zellen, sondern auch Makrophagen sind an der Beseitigung toter Zellen beteiligt. Dies konnte bestätigt werden, indem mit *E.coli* Bakterien behandelte RAW Zellen mit vitalen Zellen der Makrophagenzelllinien RAW 264.7 und J774 koinkubiert wurden, und die Phagozytose durchflusszytometrisch untersucht wurde.

Hierbei konnte beobachtet werden, dass die nekrotischen (aber zu diesem Zeitpunkt noch nicht apoptotischen) RAW Zellen sechs Stunden nach Bakterienkontakt sowohl von lebenden RAW Makrophagen als auch von der Makrophagenzelllinie J774 aufgenommen wurden. Das gleiche gilt für RAW Zellen 24 Stunden nach Koinkubation mit Bakterien: Auch diese gemischt apoptotisch-nekrotische Zellpopulation wird effektiv von den Makrophagen phagozytiert, wobei auffällt, dass kaum eine Steigerung der Aufnahme im Gegensatz zu dem früheren Zeitpunkt stattfindet (Abbildung 15).

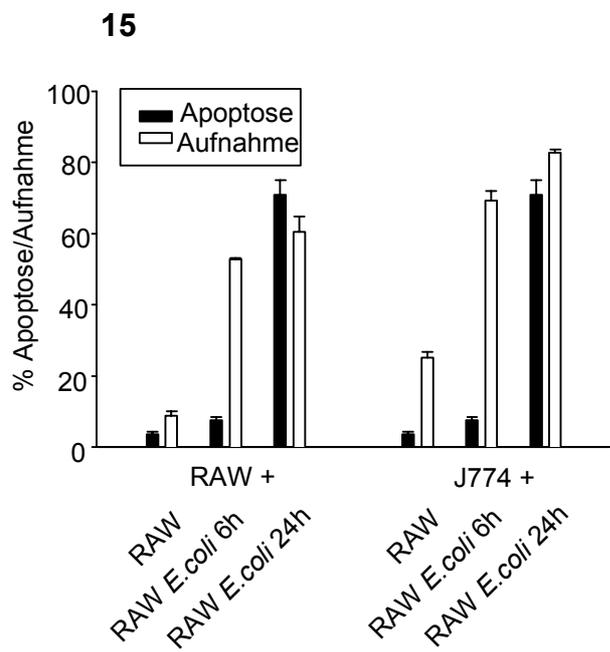


Abbildung 15: Auch RAW und J774 Zellen nehmen effektiv nekrotische RAW Zellen auf

RAW Zellen wurden mit PKH67 gefärbt und unbehandelt belassen oder mit *E.coli* Bakterien für 1 Stunde koinkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bakterienkontakt wurde die Apoptoserate in den Makrophagen durch Hoechst-Färbung und fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kernmorphologie bestimmt (schwarze Balken, mindestens 300 Zellen/Probe). Außerdem wurden die grünen RAW Zellen mit rot (PKH26) gefärbten RAW und J774 Zellen für zwei Stunden kokultiviert, fixiert, und in der Durchflusszytometrie wurde der Anteil der aufgenommenen grünen RAW Zellen bestimmt (weiße Balken, Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

2.3 Phosphatidylserin-Exposition auf nekrotischen Zellen

Die Asymmetrie der Plasmamembran spielt eine wichtige Rolle für die Phagozytose apoptotischer Zellen. Das Aminophospholipid Phosphatidylserin, das sich normalerweise auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran befindet, erscheint während der Apoptose auch auf der Außenseite der Plasmamembran. Diese Exposition von Phosphatidylserin, die durch Bindung des

Liganden Annexin V nachgewiesen werden kann, stellt ein wichtiges Signal für die Aufnahme der apoptotischen Zelle durch professionelle Phagozyten dar: Phagozytierende Zellen können entweder direkt oder über Brückenmoleküle an Phosphatidylserin binden und diese Zellen dann aufnehmen (siehe Einleitung, Punkt 2.1.1).

Wir haben untersucht, ob auch nekrotische Zellen Annexin V binden und dies somit eine Rolle in der Aufnahme dieser Zellen spielen könnte. Dabei konnte beobachtet werden, dass in der Tat ein Teil der toten, das heißt Propidiumiodid positiven Zellen sechs Stunden nach Bakterienexposition Annexin V bindet (Abbildung 16).

Phosphatidylserin könnte somit nicht nur in apoptotischen, sondern auch in nekrotischen Zellen ein Signal für die Aufnahme durch dendritische Zellen darstellen. Ob die Bindung von Annexin V jedoch wirklich eine aktive Exposition von Phosphatidylserin repräsentiert, ist bis jetzt nicht geklärt und soll in der Diskussion unter Punkt 2.2.1 weiter hinterfragt werden.

16

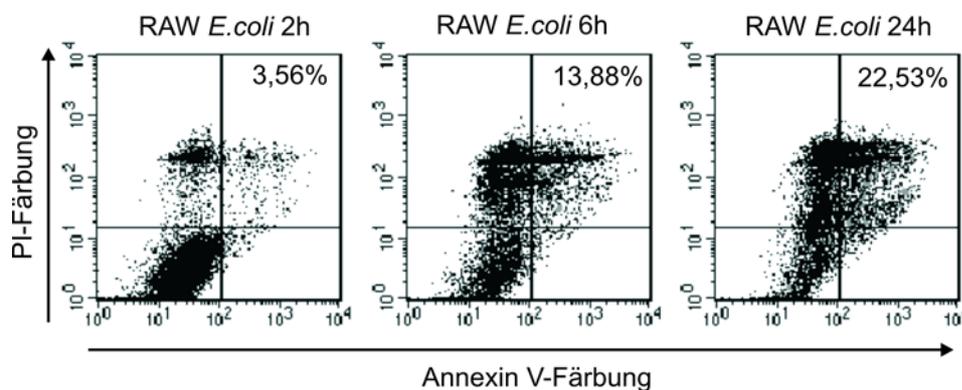


Abbildung 16: Bindungsverhalten von Annexin V an nekrotische Zellen

Mit Bakterien behandelte RAW264.7 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bakterienkontakt gesammelt, mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben sind die Prozentsätze der Zellen, die Annexin V und PI binden.

3. Reifungszustand dendritischer Zellen nach Phagozytose

Unreife dendritische Zellen, die nur in geringerem Maße die für die Entwicklung einer Immunantwort erforderlichen MHC und kostimulatorischen Moleküle exprimieren, können effektiv tote Zellen phagozytieren. Um bei der folgenden Präsentation von Antigenen an T-Zellen diese jedoch erfolgreich stimulieren zu können, müssen die dendritischen Zellen ein Reifungssignal erhalten. Daraufhin sinkt ihre Fähigkeit,

Antigene aufzunehmen, und sie exprimieren quantitativ mehr kostimulatorische und antigenpräsentierende MHC Moleküle.

In vielen Fällen wurde gezeigt, dass die Aufnahme apoptotischer Zellen nicht eine Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen bewirkt, sondern zur Toleranzentwicklung führt (siehe Einleitung Punkt 3.2.2). Wir haben untersucht, ob eine Voraktivierung der aufzunehmenden Zellen vor Apoptoseinduktion ein ausreichendes Maturationssignal für dendritische Zellen darstellt.

3.1 Koinkubation mit aktivierten apoptotischen Zellen führt zur Reifung von dendritischen Zellen

Mithilfe der Zelllinie RAW K14 haben wir die Möglichkeit, diese Zellen in Abwesenheit von TLR-Liganden über den TLR-Signaltransduktionsweg chemisch zu aktivieren (siehe Punkt 2.1.3). Diese Aktivierung ist spezifisch, das heißt, sie wirkt nur auf diese transfizierten Makrophagen und nicht zum Beispiel auf die dendritischen Zellen während der Koinkubation. Ein derartiges Modell erlaubt uns also, die Aktivierung durch eine bakterielle Infektion prinzipiell nachzuahmen, die Auswirkung des Vorhandenseins bakterieller Bestandteile jedoch auf die primär betroffenen Makrophagen zu beschränken. Diese Trennung der Systeme ist von Vorteil, da die Anwesenheit von PAMPs bei Bakterienkontakt in der Folge auch zu einer Aktivierung der dendritischen Zellen führen würde. Nur so kann eine Auswirkung der primären Makrophagenaktivierung auf den Reifungszustand dendritischer Zellen nach Phagozytose untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden RAW K14 Makrophagen durch achtstündige Inkubation in Gegenwart von Coumermycin auf „sterile“ Weise aktiviert, bevor sie durch UV-Bestrahlung einen Apoptosestimulus erhielten. Die Stimulierung der Makrophagen wurde zum einen über die Morphologie der Zellen kontrolliert: Aktivierte Makrophagen zeichnen sich durch Zytoplasmaausläufer und feste Adhärenz am Plattengrund aus. Zum anderen wurde die TNF Sekretion der Zellen gemessen (siehe Abbildung 19, Punkt 3.1.2). Nach UV-Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert, bis der Großteil der Zellen eine apoptotische Morphologie zeigte (siehe auch Abbildung 9A, Punkt 2.1.1.1). Diese aktivierten apoptotischen Makrophagen wurden daraufhin mit dendritischen Zellen für weitere 24 Stunden koinkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine Untersuchung der Expression

von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf den dendritischen Zellen, um den Maturationsgrad dieser Zellen zu messen.

Hierbei zeigte sich, dass wie erwartet Koinkubation mit unbehandelten beziehungsweise nur UV-bestrahlten RAW Makrophagen nicht zu einer Steigerung der CD86 Expression auf dendritischen Zellen führt. Kokultivierung mit nur aktivierten RAW Makrophagen, die ja auf dendritische Zellen einwirkende proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und TNF produzieren, bewirkte eine leichte Zunahme der Oberflächenexpression von CD86. Wurden die dendritischen Zellen jedoch mit aktivierten apoptotischen Makrophagen koinkubiert, führte dies dazu, dass nahezu die gesamte Population der CD11c-positiven Zellen den Aktivierungsmarker CD86 auf einem hohen Niveau exprimierte. Diese Expression war vergleichbar mit der von dendritischen Zellen stimuliert durch LPS (siehe Abbildung 17 A und B).

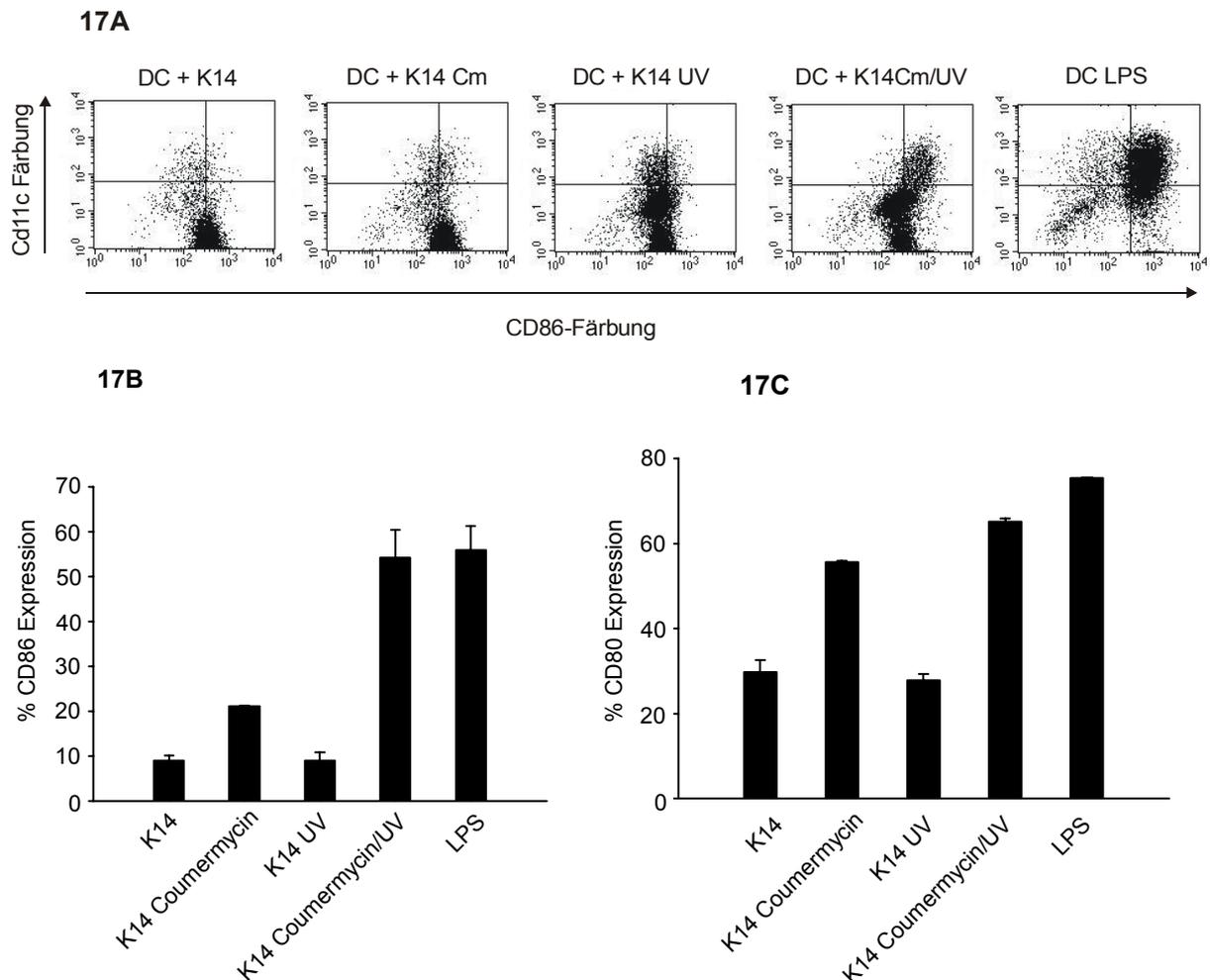


Abbildung 17: Aktivierte apoptotische RAW264.7 Zellen induzieren Reifung von primären dendritischen Zellen

RAW K14 Zellen wurden unbehandelt belassen oder während 8 Stunden mittels Coumermycin (Cm) stimuliert. Anschließend wurde ein Teil UV-bestrahlt, und die Zellen wurden unter normalen Bedingungen weiterkultiviert. Nach 16 Stunden wurden die RAW K14 Zellen gesammelt und mit primären Knochenmarks-dendritischen Zellen für weitere 24 Stunden koinkubiert. Als Positivkontrolle

der Reifung wurden dendritische Zellen für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit FITC-markierten CD86- (17A/B) oder CD80- (17C) Antikörpern und mit CD11c-PE zur Identifikation der dendritischen Zellen. Die Zellen wurden fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. 17B/C: Angegeben ist der Anteil der CD86 (17B) bzw. CD80 (17C) positiven Zellen an allen dendritischen, das heißt CD11c positiven Zellen (Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben).

Ähnlich verhielt sich der Oberflächenaktivierungsmarker CD80. Hier wurde jedoch bereits bei Inkubation mit nur aktivierten RAW Makrophagen eine starke Hochregulation dieses Oberflächenmoleküls auf dendritischen Zellen beobachtet. Diese Expression konnte nur noch in geringem Maße in der Anwesenheit von aktivierten apoptotischen RAW Zellen gesteigert werden (Abbildung 17 C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kombination aus Aktivierung und Apoptoseinduktion in Makrophagen ein effektives Reifungssignal für dendritische Zellen nach Koinkubation darstellt.

3.2 Der Überstand der aktivierten toten Makrophagen ist ausreichend zur Aktivierung von dendritischen Zellen

In Anbetracht der bisherigen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen aktivierten apoptotischen Makrophagen und dendritischen Zellen beziehungsweise der Prozess der Phagozytose für die Aktivierung der DC notwendig ist. Alternativ könnten auch sekretorische Produkte der sterbenden aktivierten Zellen als Reifungssignal ausreichen.

Um diese Frage zu klären, wurden dendritische Zellen sowohl mit aktivierten apoptotischen Makrophagen in deren Überstand als auch mit beiden Komponenten getrennt voneinander, das heißt nur Zellen oder Überstand, koinkubiert.

Hierbei fiel auf, dass aktivierte apoptotische Zellen in frischem Medium kaum eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bewirken. Der von diesen Zellen befreite Überstand jedoch reichte aus, um eine deutliche Expressionssteigerung dieser Oberflächenmarker zu erreichen (Abbildung 18 A).

Ein weiteres für die Kostimulation von T-Zellen wichtiges Oberflächenmolekül ist CD40. Das Expressionsniveau dieses Markers wurde nach Inkubation mit dem Überstand unbehandelter, aktivierter, apoptotischer und aktivierter apoptotischer RAW K14 Makrophagen untersucht. Auch hier zeigte sich, dass sich im Überstand von vor Apoptoseinduktion aktivierter Zellen Komponenten befinden, die ausreichen, um eine Hochregulation des Aktivitätsmarkers CD40 zu erreichen. Das Medium von

nur aktivierten Zellen führte hier ebenso nur zu einer geringen Steigerung des Reifungsgrades von dendritischen Zellen (Abbildung 18 B).

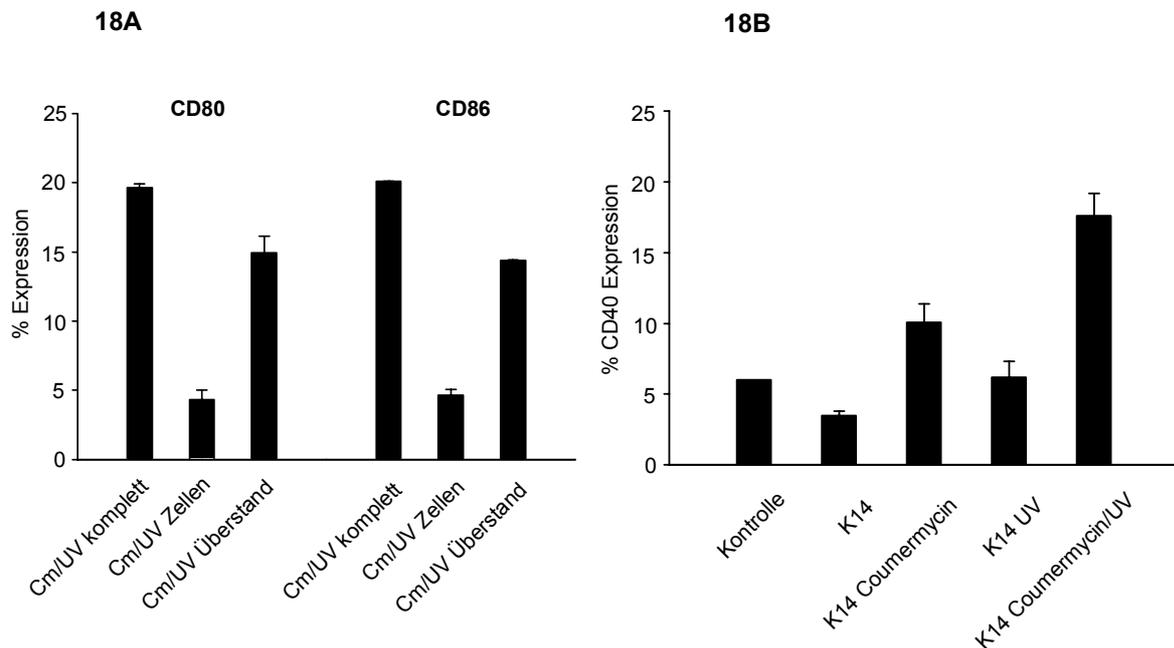


Abbildung 18: Der Überstand der aktivierten apoptotischen Zellen ist ausreichend für die Reifung dendritischer Zellen

18A: RAW K14 Zellen wurden für 8 Stunden mit Coumermycin (Cm) stimuliert, dann UV-bestrahlt und weiter unter normalen Bedingungen kultiviert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen samt Überstand gesammelt, zum Teil wurde der Überstand von den Zellen getrennt. Die so gewonnenen Komponenten wurden einzeln oder gemeinsam zu primären dendritischen Zellen hinzugefügt und diese für 24 Stunden weiterkultiviert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit FITC-markierten CD86- oder CD80- Antikörpern und mit CD11c-PE. Der Anteil der in hohem Maße CD80 bzw. CD86 exprimierenden dendritischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben). **18B:** RAW K14 Zellen wurden wie angegeben behandelt. 16 Stunden nach UV-Bestrahlung wurde der Überstand der Zellen gesammelt und mit primären dendritischen Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit CD40-FITC und CD11c-PE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben ist der Anteil der in höherem Maße CD40 exprimierenden Zellen (Mittelwert und Standardabweichung aus Doppelproben).

All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass durch vor Apoptoseinduktion stattfindender Aktivierung in den sterbenden Zellen ein oder mehrere lösliche Faktor(en) freigesetzt werden, die einen Reifungsstimulus für dendritische Zellen darstellen.

3.3 Die Aktivierung ist nicht zurückzuführen auf erhöhte TNF Freisetzung aus sterbenden aktivierten Zellen

Als Kandidat für eine effektive Aktivierung dendritischer Zellen käme von aktivierten RAW Makrophagen produziertes TNF in Frage. Es erschiene möglich, dass durch die

Aktivierung der Makrophagen produziertes TNF beim Untergang dieser Zellen zusätzlich freigesetzt wird.

Um dies zu untersuchen, wurde die TNF-Sekretion im Überstand stimulierter apoptotischer RAW Makrophagen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass Apoptoseinduktion nach Stimulation dieser Zellen im Gegensatz zu alleiniger Stimulation nicht zu einem Anstieg der Konzentration von TNF im Überstand führt (Abbildung 19).

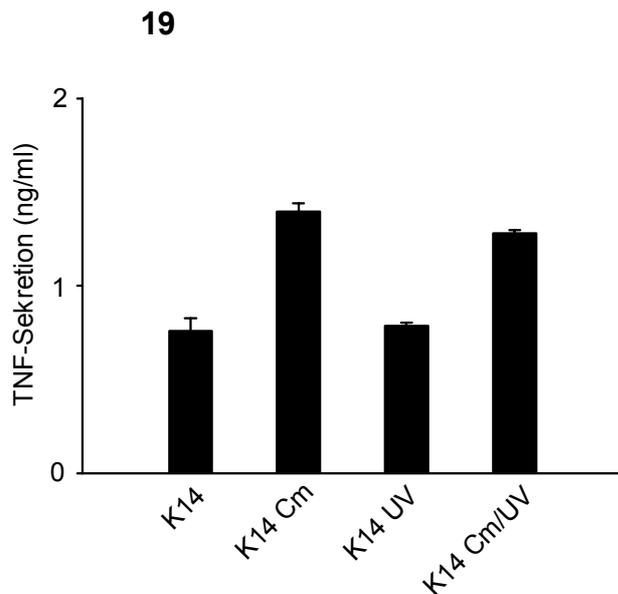


Abbildung 19: Aktivierte apoptotische RAW Zellen produzieren nicht eine größere Menge an TNF.

RAW K14 Zellen wurden unbehandelt belassen oder während 8 Stunden mittels Coumermycin (Cm) stimuliert. Anschließend wurde ein Teil UV-bestrahlt, und die Zellen wurden für 16 Stunden unter normalen Bedingungen weiterkultiviert. Nach 16 Stunden wurde der Überstand der so behandelten Zellen gewonnen. In diesem wurde per ELISA die Menge an TNF bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachproben.

Es ist somit unwahrscheinlich, dass TNF eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung dendritischer Zellen durch aktivierte apoptotische Makrophagen spielt.

4. Dendritische Zellen können aufgenommenes Antigen an CD8⁺ T-Zellen kreuz-präsentieren

Dendritische Zellen haben die Fähigkeit, aufgenommenes Antigen auf MHC Oberflächenmolekülen an antigenspezifische T-Zellen zu präsentieren, um so eine effektive Immunantwort einzuleiten. Eine Besonderheit der dendritischen Zellen ist dabei, dass dies nicht nur auf MHC Klasse II Molekülen, auf denen auch andere Zellen exogene Antigene präsentieren, sondern auch auf MHC Klasse I Molekülen

stattfinden kann: Dendritische Zellen können „kreuz-präsentieren“. Auf diese Weise können nicht nur CD4⁺ T-Helferzellen, sondern auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen direkt als Präsentationsziel einbezogen werden (siehe auch Einleitung Punkt 3.1).

Um zu testen, ob dendritische Zellen Antigen aus aufgenommenen toten Zellen an T-Zellen präsentieren, wurde das T-Zell Hybridom B3Z verwendet. Diese T-Zellen tragen das lacZ Gen von *E.coli* unter einem Promoter, dessen Aktivität durch den Transkriptionsfaktor NFAT geregelt wird und aktivieren das lacZ-Gen, wenn ihnen OVA auf einem determinierten MHC Klasse I Molekül präsentiert wird. Induktion des lacZ-Gens führt zur Produktion von β -Galactosidase, was durch Zugabe von chromogenen Substraten visualisiert werden kann. Somit können also durch Präsentation stimulierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen sichtbar gemacht werden (Karttunen et al., 1992). Mithilfe der T-Zelllinie B3Z konnten wir somit untersuchen, ob Antigene aus der gemischt apoptotisch-nekrotischen Makrophagenpopulation nach Phagozytose von Bakterien und aus apoptotischen Zellen nach UV-Bestrahlung effektiv von dendritischen Zellen kreuz-präsentiert wurden.

Mit *E.coli* Bakterien behandelte beziehungsweise UV-bestrahlte OVA exprimierende RAW Makrophagen wurden für 16-20 Stunden zuerst mit dendritischen Zellen kokultiviert. Während dieser Zeit wurden die toten Makrophagen von den vitalen dendritischen Zellen aufgenommen. Darauf folgte eine weitere Koinkubation dieser gemischten Zellpopulation zusammen mit B3Z T-Zellen. Die T-Zellen, die dabei durch Präsentation von OVA (stammend aus den durch die dendritischen Zellen phagozytierten toten Makrophagen, die OVA exprimieren, Abbildung 20A) erfolgreich stimuliert wurden, wurden daraufhin durch Nachweis von β -Galactosidase sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet. Auch wenn dieses Modell eines Präsentationsassays sich in unseren Versuchen als eine für Störungen recht anfällige Methodik darstellte, so konnten jedoch Aussagen über das prinzipielle Vermögen dendritischer Zellen zur Antigenpräsentation nach Phagozytose toter Zellen getroffen werden.

So konnte beobachtet werden, dass dendritische Zellen nach Aufnahme *E.coli* behandelter OVA exprimierender RAW Makrophagen Antigen aus diesen Zellen erfolgreich auf MHC Klasse I Molekülen an T-Zellen präsentieren (Abbildung 20 B). Auffallend ist jedoch, dass die Anwesenheit von Bakterien beziehungsweise von mit Bakterien behandelten RAW Zellen ausreicht, um OVA-spezifische T-Zellen auch in Abwesenheit von OVA (wenn auch in geringerem Ausmaß) zu stimulieren.

Koinkubation von lebenden (OVA-) RAW Makrophagen mit dendritischen Zellen liefert dagegen nur eine geringe Zahl durch Präsentation stimulierter T-Zellen (Abbildung 20B).

Auch Antigen aus UV-bestrahlten OVA-RAW Zellen wurde erfolgreich von phagozytierenden dendritischen Zellen an CD8⁺ T-Zellen kreuz-präsentiert: Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung von spezifisch aktivierten T-Zellen. Dagegen bleibt nach Koinkubation von dendritischen Zellen mit UV-bestrahlten, aber nicht OVA enthaltenden RAW Zellen beziehungsweise mit unbehandelten vitalen (OVA-) RAW Makrophagen die Zahl der stimulierten T-Zellen gering (Abbildung 20C).

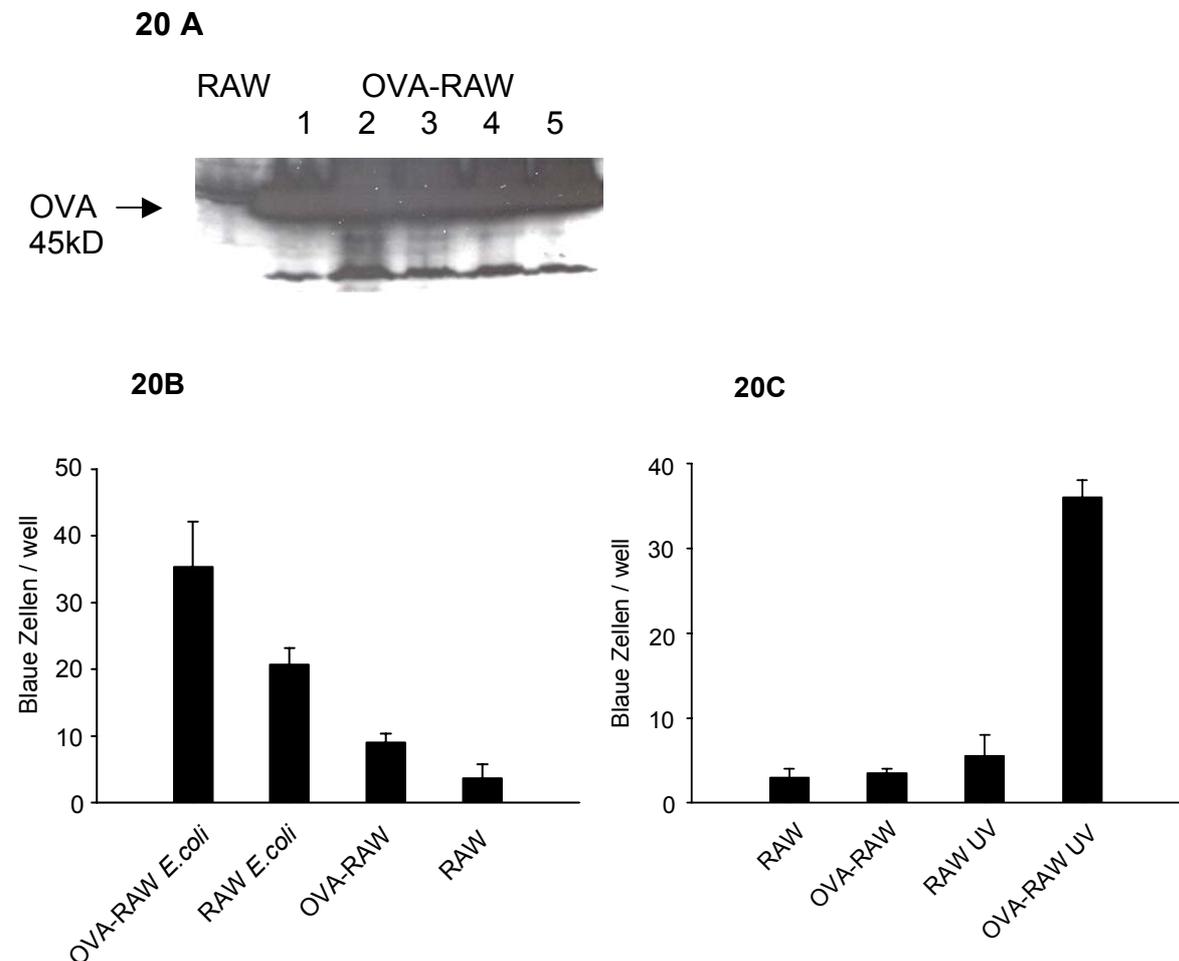


Abbildung 20: Dendritische Zellen können erfolgreich Antigene aus toten RAW Zellen an T-Zellen präsentieren

20A: OVA-exprimierende RAW Zellen nach Transfektion. Mit OVA durch Elektroporation transfizierte RAW Zellen (Klone 1-5) exprimieren OVA: Western-Blotting-Nachweis.

20 B/C: RAW Zellen und RAW Zellen, die stabil OVA exprimieren, wurden wie angegeben mit Bakterien inkubiert (20B) oder UV-bestrahlt (20C). Die so behandelten Zellen wurden nach 20 Stunden für 24 Stunden im Verhältnis von 1:1 mit primären dendritischen Zellen koinkubiert. Je 5×10^5 dendritische Zellen und 5×10^5 RAW Makrophagen wurden dann mit 1×10^5 B3Z T-Zellen für weitere 20 Stunden kokultiviert. Die T-Zellen, die durch eine Präsentation von OVA durch DC aktiviert wurden,

wurden durch eine X-Galactosidase- Färbung sichtbar gemacht und lichtmikroskopisch ausgezählt (Mittelwert und Standardabweichung aus Dreifachproben).

Aus toten apoptotischen oder gemischt apoptotisch-nekrotischen Phagozyten stammende Antigene werden somit effektiv von den aufnehmenden dendritischen Zellen an T-Zellen präsentiert. Dadurch erscheint es möglich, dass der Zelltod in Phagozyten nach Aufnahme von *E.coli* Bakterien den Beginn der Entwicklung einer spezifischen anti-bakteriellen Immunantwort darstellt.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Mechanismen der Apoptose- und Nekroseinduktion in myeloiden Zellen durch mikrobielle Infektionserreger und ihre Bestandteile untersucht. Sowohl bei der Apoptose als auch der Nekrose konnten wesentliche neue Aspekte herausgearbeitet werden. Im letzten Teil der Arbeit wurde die Frage untersucht, wie sich Apoptose auf die Initiierung einer Immunantwort auswirken kann. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Zelltod, der während Infektionen auftritt, ein wichtiges bestimmendes Ereignis für die Entwicklung der Immunantwort darstellt.

1. Bakterien-induzierter Zelltod in Phagozyten

1.1 Induktion von apoptotischem Zelltod in Phagozyten

Koinkubation von *E.coli* Bakterien mit Makrophagen führte zu einer effektiven Aufnahme der Bakterien durch die Phagozyten. Bereits nach vier bis sechs Stunden schienen die Bakterien weitgehend aktiv verdaut worden zu sein (Hacker et al., 2002). Bei weiterer Kultivierung der Makrophagen findet sich bis zu einem Zeitraum von sechs bis acht Stunden keine relevante Erhöhung der Zahl der apoptotischen Zellen. Zwischen acht und 22 Stunden jedoch stirbt ein Großteil der Zellen durch Apoptose (Punkt 2.2.2 Abbildung 10A). Es ist also unwahrscheinlich, dass ein intrazelluläres Wachstum der Bakterien zu diesem Zelltod führt. Für die Induktion der Apoptose scheint jedoch der Prozess der Aufnahme der Bakterien wichtig zu sein: Hitzeinaktivierte Bakterien, die nur noch spärlich von den Makrophagen phagozytiert werden (Hacker et al., 2002), führen nur noch in sehr geringem Maß zu apoptotischem Zelltod (siehe Punkt 1.1.5, Abbildung 5A).

Hinweise auf den Transduktionsweg der Apoptose liefert die Beobachtung, dass bei Bcl-2 exprimierenden RAW Makrophagen der Prozess der Apoptose fast vollständig blockiert ist (siehe Punkt 1.1.4 Abbildung 4B). Bei der Untersuchung der Signaltransduktion oberhalb von Bcl-2 konnte erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das BH3-only Protein Bim/Bod hier an der Auslösung von Apoptose beteiligt ist (Kirschnek et al., 2005). Über eine Aktivierung der Toll like Rezeptoren und des Mediators MyD88 kommt es nach Bakterienkontakt zu einer

verstärkten Bim-Expression. Dies alleine reicht jedoch nicht, um Apoptose in den Zellen zu induzieren: Als zweite wichtige Voraussetzung muss der Prozess der Phagozytose ein weiteres Signal liefern. In der Kombination führt die Phagozytose der Bakterien zusammen mit der Hochregulierung von Bim dann zu apoptotischem Zelltod in den Phagozyten.

1.2 Induktion von nekrotischem Zelltod in Phagozyten

Während der apoptotische Zelltod in Phagozyten nach Aufnahme der Bakterien erst ein relativ später Prozess ist, lässt sich bereits vier bis sechs Stunden nach Bakterienkontakt eine Population nekrotischer Zellen nachweisen. Die Prozesse, die sich während der Nekrose abspielen, und die Bedeutung des nekrotischen Zelltods sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.2.1 Mechanismus der Nekrose in unserem Modell

Die genauen Abläufe der Nekrose auf molekularer Ebene sind bis heute noch nicht genau bekannt. Einzelne Rezeptoren, Botenstoffe und Exekutoren des nekrotischen Zelltods konnten jedoch bereits identifiziert werden (siehe Einleitung Punkt 1.2.3).

Klar ist, dass es nicht nur einen einzigen Mechanismus gibt, der bei der Auslösung von Nekrose eine Rolle spielt, vielmehr scheinen je nach Zellart und Umständen, unter denen der nekrotische Zelltod induziert wird, verschiedene Wege zum gleichen Ziel zu führen.

1.2.1.1 Rolle der Stresskinase p38 und einer Überexpression von Bcl-2

Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des apoptotischen Zelltods. Doch können anti-apoptotische Mitglieder dieser Familie anscheinend in manchen Fällen nicht nur Apoptose, sondern auch Nekrose inhibieren: So wurde nekrotischer Zelltod nach chemischer Anoxie (Shimizu et al., 1996), myokardialer Ischämie (Brocheriou et al., 2000), Behandlung mit Staurosporin (Single et al., 2001) oder einer Kombination von Zytokinen (Saldeen, 2000) bei Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L verzögert bzw. verhindert. Auch wir haben den Einfluss von Bcl-2-Überexpression auf den nekrotischen Zelltod untersucht. Dabei

konnten wir beobachten, dass zwar das Ausmaß der Apoptose in Bcl-2-exprimierenden RAW Zellen nach Behandlung mit Bakterien stark reduziert ist (siehe Punkt 1.1.4, Abbildung 4B); die so vorbehandelten Zellen wurden jedoch wegen des trotzdem stattfindenden nekrotischen Zelltods effektiv von dendritischen Zellen aufgenommen (siehe Punkt 2.2.2, Abbildung 10D). Somit bietet eine Überexpression von Bcl-2 in unserem System nur einen Schutz vor Apoptose, nicht jedoch vor dem nekrotischen Zelltod. Es ist zu bedenken, dass grundsätzlich unklar ist, ob eine Überexpression antiapoptotischer Proteine wirklich direkt zu einer Blockierung von Nekrose führen kann. Denkbar ist auch, dass hierbei eigentlich nur Apoptose inhibiert wird, und andere Effekte den Prozess bei persistierendem Zelltod-Stimulus in Richtung Nekrose treiben könnten.

Wie bereits unter Punkt 1.2.3 berichtet, konnten einige Autoren beobachten, dass die Stresskinase p38 nicht nur in der Apoptose, sondern auch für die Entstehung des nekrotischen Zelltods eine Rolle spielt. So konnte bei Ischämie durch Suppression von p38 die Formation einer nekrotischen Zone im Myokard (Ma et al., 1999) und in der Hippocampus Region CA1 (Sugino et al., 2000) reduziert werden. Das gleiche gilt für Nekrose, die durch das Toxin A von *Clostridium difficile* induziert wird: Auch hier konnten Warny et al. eine verminderte Zelltodrate in Monozyten nach Inhibition von p38 beobachten (Warny et al., 2000). In unserem System scheint jedoch p38 in der Entstehung von Nekrose keine bedeutende Rolle zu spielen: Zwar ist unter dem Einfluss des p38 Kinaseninhibitors SB203580 der Anteil apoptotischer RAW Zellen nach Koinkubation mit *E.coli* Bakterien deutlich reduziert, die Zellen scheinen jedoch trotzdem durch Nekrose zu sterben, da sie von dendritischen Zellen phagozytiert werden (siehe Punkt 2.1.1, Abbildung 12). Eine wesentliche Beteiligung von p38 an der Entstehung des nekrotischen Zelltodes durch DH5α *E.coli* erscheint somit unwahrscheinlich.

1.2.1.2 Eine mögliche Bedeutung von Caspasen für den nekrotischen Zelltod?

Ob Caspasen auch eine Rolle im Prozess der Nekrose spielen, ist bis jetzt nicht genau geklärt. Einerseits gibt es Modelle, in denen eine Inhibition von Caspasen nicht nur Apoptose verhindert, sondern auch zu einem stärker ausgeprägtem nekrotischen Zelltod führt: So bewirkt beispielsweise eine Blockierung von Caspasen in L929 Fibrosarkom-Zellen eine um den Faktor 1000 erhöhte Sensitivität gegenüber

TNF-induzierter Nekrose (Vercammen et al., 1998a). Ein ähnlicher Effekt wurde beobachtet während des sogenannten excitotoxischen Tods von Neuronen im Hippocampus (Glazner et al., 2000).

Doch überraschenderweise gibt es auch Beispiele, in denen für die Ausführung des nekrotischen Programms möglicherweise Caspasenaktivierung benötigt wird. So konnten Leist et al. nachweisen, dass nekrotischer Zelltod verursacht durch ATP-Depletion in CD95-stimulierten Jurkat Zellen durch den Pancaspasen-Inhibitor z-VAD.fmk inhibierbar ist (Leist et al., 1997). Ob dies ein direkter Effekt von z-VAD ist, bleibt jedoch unklar. Andere Gruppen beobachteten eine Verminderung der TNF-induzierten Nekrose in Enterozyten (Ruemmele et al., 1999) und Fibrosarkom-Zellen (Faraco et al., 1999) in Anwesenheit von z-VAD. Eine Suppression von Caspasen bewirkte weiterhin eine Verhinderung von Nekrose verursacht durch das Toxin A von *C. difficile* oder das Toxin α von *Staph. aureus* (Warny and Kelly, 1999). Die Rolle, die Caspasen für die Nekrose spielen, scheint somit zu variieren: Ihre Inhibition kann je nach Zelllinie und Stimulus den nekrotischen Zelltod supprimieren oder aktivieren. In unserem System scheinen Caspasen für den Zelltod in Makrophagen durch Nekrose nach Behandlung mit Bakterien nicht wesentlich zu sein: RAW Makrophagen, die in Anwesenheit des Pancaspasen-Inhibitors z-VAD.fmk mit *E.coli* Bakterien inkubiert werden, weisen eine Suppression der Zahl der apoptotischen und eine Zunahme der nekrotischen Zellen auf (siehe Punkt 1.1.4, Abbildung 4A). Der Prozentsatz der sterbenden Population bleibt jedoch vergleichbar: Der Teil der Zellen, der in Abwesenheit von z-VAD durch Apoptose stirbt, scheint in Anwesenheit des Caspaseninhibitors zusätzlich durch Nekrose zu sterben. Wie genau diese Änderung der Form des Zelltods von Apoptose zu Nekrose funktioniert, ist unklar. Denkbar ist, dass die Caspasen-Inhibition die Caspasen-abhängige PARP-Inaktivierung verhindert. Es wird vermutet, dass PARP, eine Poly-ADP-Ribose-Polymerase, durch Verbrauch von ATP für das Substrat NAD^+ Apoptose blockieren und Nekrose induzieren kann. Die Bedeutung des intrazellulären ATP-Gehalts für die Entscheidung Apoptose oder Nekrose unterstreichen Beobachtungen von Eguchi et al. Bei Zugabe von Oligomycin, das die mitochondriale ATP-Synthese blockiert, zu mit Fas Ligand stimulierten Zellen, erfolgte eine Änderung der Zelltodart von Apoptose zu Nekrose (Eguchi et al., 1997). Auch Ueda et al. propagieren die Bedeutung des intrazellulären ATP-Gehalts für den Wechsel des zuerst nekrotischen, dann apoptotischen Zelltod nach Ischämie im Gehirn (Ueda and Fujita,

2004). Fällt nun in unserem System die Inaktivierung von PARP durch Blockierung der Caspasen aus, könnte es zu einem Absinken der ATP-Konzentration kommen und somit der apoptotische Zelltod durch Nekrose ersetzt werden.

1.2.1.3 Induktion von Nekrose über Toll like Rezeptoren

Bereits in der Vergangenheit konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass hitzeinaktivierte *E.coli* Bakterien, die sich in einer Gram-Färbung nicht von unbehandelten Bakterien unterscheiden, kaum von RAW Makrophagen aufgenommen werden (Hacker et al., 2002). Diese Aufnahme scheint jedoch unabdingbar für die Auslösung von Apoptose zu sein: Ähnlich wie das Ausmaß, aufgenommen zu werden, ist bei hitzeinaktivierten Bakterien auch die Fähigkeit verringert, Apoptose in Makrophagen zu induzieren (siehe auch Punkt 1.1.5, Abbildung 5a). Auffallend ist jedoch, dass die Fähigkeit der hitzebehandelten Bakterien, Makrophagen zu stimulieren, kaum eingeschränkt ist: So ließen sich nach Stimulation mit normalen oder hitzeinaktivierten *E.coli* keine wesentlichen Unterschiede in der TNF-Produktion oder der Aktivierung der Proteinkinasen ERK1/2 bei RAW Zellen feststellen (Hacker et al., 2002). Genauso unverändert wie das Vermögen, Zellen zu aktivieren, erweist sich nun auch die Fähigkeit, Nekrose in Makrophagen zu induzieren: Egal ob unbehandelte oder hitzeinaktivierte Bakterien mit RAW Zellen kokkubiert wurden, die Rate der Vitalfarbstoff aufnehmenden Zellen sechs Stunden nach Bakterienkontakt ist vergleichbar (siehe Punkt 1.1.5, Abbildung 5B). Dies wirft die Frage auf, ob die Aktivierung und der Prozess der Nekrose über ähnliche Moleküle oder Rezeptoren getriggert werden. Eine wichtige Rolle in der Erkennung bakterieller Komponenten in Makrophagen und nachfolgender Aktivierung spielen die Toll-like Rezeptoren. Auch kann über TLR, z.B. über TLR2 in humanen Fibroblasten (Aliprantis et al., 1999), oder über TLR4 in *Yersinia*-infizierten Makrophagen (Haase et al., 2003) Apoptose induziert werden. Ob über TLR Liganden auch nekrotischer Zelltod ausgelöst werden kann, wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Behandlung von Makrophagen mit einem Gemisch aus dem Lipopeptid Pam₃Cys (einem TLR2 Liganden), LPS (einem TLR4 Liganden) und CpG Oligonucleotiden (TLR9 Liganden) untersucht. Während die einzelnen Komponenten nur einen geringen Einfluss auf die Nekroserate in RAW Makrophagen zeigen (siehe auch Punkt 2.1.2, Abbildung 13), konnte die Kombination der drei TLR Liganden

effektiv Nekrose in den Zellen auslösen, während kaum apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten (Kirschnek et al., 2004). Dies scheint jedoch nicht von dem Adaptermolekül MyD88 abhängig zu sein. Auch spielt anscheinend eine Sekretion von TNF nach Stimulation durch TLR Liganden bei der Nekroseinduktion keine wesentliche Rolle.

In der Literatur ist beschrieben, dass auch über Todesrezeptoren, die sich mit den Toll like Rezeptoren einige Signaltransduktoren (wie zum Beispiel die Aktivierung von NF- κ B) teilen, Nekrose ausgelöst werden kann. Hierbei spielt das Rezeptor-interagierende Protein RIP eine bedeutende Rolle (Holler et al., 2000). Da nun sowohl über Todesrezeptoren als auch über TLR Nekrose induziert werden kann und beide Transduktionswege ähnliche Moleküle benutzen, ist es denkbar, dass die RIP-verwandte Kinase RIP2, die beteiligt ist an der TLR2/3/4-abhängigen Aktivierung von NF- κ B, in der TLR-medierten Nekrose eine ähnliche Bedeutung hat.

Auch die Kalzium-Konzentration könnte in der durch Toll like Rezeptoren initiierten Nekrose eine Rolle spielen. In Arbeiten von Ismaili et al. führte eine Ligandierung von TLRs zu einer Erhöhung intrazellulärer Kalzium-Ionen in dendritischen Zellen (Ismaili et al., 2002). Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wiederum, zum Beispiel als Folge einer Mutation eines Ionenkanals in *C. elegans*, kann nekrotischen Zelltod verursachen (Xu et al., 2001). Dies mag zum Teil daran liegen, dass eine erhöhte Kalziumkonzentration zu einer Aktivierung der Phospholipase A2 und somit zu einer Zerstörung von zum Beispiel mitochondrialen Membranen führt (Malis and Bonventre, 1988). Kalzium kommt somit als möglicher Mediator bei durch TLR induzierter Nekrose in Frage.

1.2.2 Apoptose und Nekrose – völlig gegensätzliche Formen des Zelltods?

In vielen Fällen ist die Abgrenzung von Apoptose und Nekrose klar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass zum Beispiel während der Embryonalentwicklung Nekrose Apoptose als Substitut ersetzen kann. So kann der Verlust von Neuronen aus dem Rückenmark und aus dem Hirnstamm nach Blockierung von Apoptose durch genetische Deletion der Caspasen 3 und 9 nicht verhindert werden (Oppenheim et al., 2001). In Mausembryonen, die eine Mutation im APAF-1-Gen tragen, oder in denen Caspasen medikamentös inhibiert werden, tritt der Verlust interdigitaler Zellen

durch Nekrose auf. Ein derartiger nekrotischer Zelltod konnte jedoch auch schon in Wildtyp-Mäusen beobachtet werden (Chautan et al., 1999).

All diese Beispiele weisen darauf hin, dass nekrotischer Zelltod Apoptose ersetzen kann, wenn diese blockiert wird. So auch in dem hier untersuchten Fall: Werden RAW Zellen in Anwesenheit des Caspaseninhibitors z-VAD.fmk mit *E.coli* Bakterien inkubiert, so ist die Apoptose fast vollständig inhibiert, während eine größere Population nun durch Nekrose stirbt. Der Anteil der toten Zellen an der gesamten Zellpopulation bleibt dabei ähnlich groß (siehe Punkt 1.1.4, Abbildung 4A). Ähnliches ist bei Überexpression von Bcl-2 zu beobachten: In diesen RAW Makrophagen ist nach Bakterienkontakt zwar kaum noch Apoptose zu beobachten, die Zellen werden aber wegen des trotzdem stattfindenden nekrotischen Zelltods von dendritischen Zellen effektiv phagozytiert (siehe Punkt 2.2.2, Abbildung 10D).

Es gibt auch Situationen - wie zum Beispiel im Schlaganfall - , wo die Trennungslinie zwischen beiden Zelltodarten verschwimmt (Lipton and Nicotera, 1998), manchmal scheinen beide Arten des Zelltodes ineinander übergehen zu können. Zumindest in vitro führt auch eine Induktion von Apoptose irgendwann zu einer Permeabilisation der Plasmamembran, die Zelle unterliegt einer sekundären Nekrose – in vivo wird dieses Phänomen wegen schneller Beseitigung apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten eher selten gesehen (Proskuryakov et al., 2003). Diese sekundäre Nekrose nach primär stattfindender Apoptose wird in der Literatur häufiger beschrieben. In unserem System nun stellt sich die Reihenfolge anders dar: Zu frühen Zeitpunkten, bereits 4-6 Stunden nach Bakterienkontakt, können nekrotische Zellen nachgewiesen werden, während apoptotische Zellen erst nach 16-20 Stunden beobachtet werden. Hierbei stellt sich die Frage, ob derartige primär nekrotische Zellen auch noch sekundäre Apoptose zeigen können, oder ob es sich hierbei um verschiedene Zelltodarten in verschiedenen Zellen handelt. Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der Makrophagen 24 Stunden nach Behandlung mit *E.coli* Bakterien lassen sich zumindest Zellen finden, die das typische Kernmuster apoptotischer Zellen aufweisen, jedoch auch eine eindeutige Zerstörung der Plasmamembran als Merkmal nekrotischer Zellen zeigen (siehe Punkt 1.1.3, Abbildung 3A und B). Bei diesen Zellen lässt sich jedoch nicht klären, welche Form des Zelltodes zuerst aufgetreten ist. Die Tatsache, dass sich in einigen Versuchen die Zahl der früh-nekrotischen Zellen 6 Stunden nach Bakterienkontakt und die Zahl der spät-apoptotischen Makrophagen nach 24 Stunden zu einem

Prozentsatz von weit über 100 addiert, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass trotz frühen Verlusts der Integrität der Plasmamembran noch ein Zelltod durch Apoptose möglich ist. Dass Nekrose nicht gleichbedeutend mit einem sofortigen Verlust aller Zellfunktionen ist, wird aktuell in ersten Untersuchungen deutlich: So konnten Saelens et al. nachweisen, dass die Möglichkeit zur Proteinsynthese während des nekrotischen Zelltods persistiert (Saelens et al., 2005).

Ein Zelltyp kann verschiedene Stimuli sowohl mit nekrotischem als auch mit apoptotischem Zelltod beantworten – was genau das Zellschicksal bestimmt, ist nicht ganz klar. Eine Rolle spielt dabei in anderen Systemen die Intensität des Stimulus, das Expressionsniveau von Signal-Transduktoren und das Ausmaß des vorhandenen Kalziums und ATP (Yamashima, 2000). Auch scheint es manchmal wichtig zu sein, ob ein Stimulus akut oder chronisch auftritt (Choi, 1992). In dem hier untersuchten Fall führt nun *ein* Stimulus, nämlich der Kontakt mit niedrig pathogenen *E.coli* Bakterien, zu apoptotischem *und* nekrotischem Zelltod. Es scheint also möglich zu sein, dass unter den gleichen Bedingungen beide Zelltodformen initiiert werden.

1.2.3 Nekrose – ein physiologisch relevanter Prozess?

Lange Zeit galt Apoptose als geordnete, fein geregelte Form des Zelltodes, Nekrose jedoch im Gegensatz dazu als ungeordneter Zusammenbruch einer Zelle unter extremen Bedingungen. Nun verdichten sich jedoch die Hinweise darauf, dass auch der nekrotische Zelltod einem festgelegten Programm unterliegt, das bei genauer Kenntnis der Abläufe auch inhibiert werden kann. Ein Kritikpunkt dieses Konzepts der Nekrose als programmierter Ablauf war jedoch stets, dass diese Form des Zelltodes nur in Situationen auftrat, in denen Apoptose entweder chemisch oder genetisch inhibiert wurde.

Wir konnten nun zwei verschiedene Situationen beobachten, in denen Nekrose unter Bedingungen auftritt, die während einer Infektion erwartet werden können:

Vaccinia Viren tragen - wie auch eine Vielzahl anderer Viren - Gene in sich, die die Apoptose ihrer Wirtszellen, die sie zur Vermehrung brauchen, verhindern. Nach Infektion von RAW Zellen und primären Knochenmarksmakrophagen mit dem Vaccinia Virus MVA konnten wir nun feststellen, dass die Zellen wie erwartet keine apoptotische Morphologie aufwiesen (siehe Punkt 1.2, Abbildung 7B und 7D). Trotzdem starb ein Großteil der Zellen, jedoch nicht durch Apoptose, sondern durch

Nekrose: Die Makrophagen nahmen aufgrund defekter Plasmamembranen 19-24 Stunden nach Infektion den Vitalfarbstoff Eosin auf (Abbildung 7A und 7C). In neueren Arbeiten wird beschrieben, dass manche Viren auch Gene enthalten, die das Programm der Nekrose unterdrücken können (Chan et al., 2003). Die während dieser Untersuchungen gemachte Beobachtung, dass Mäuse, die das TNFR2 Protein nicht exprimieren und somit eine virale Infektion nicht mit Nekrose beantworten können, das Virus auch nicht so effektiv eliminieren können, weist der Nekrose eine mögliche Rolle in der Entwicklung einer Immunantwort zu.

Weiterhin konnten wir feststellen, dass auch die Infektion mit *E.coli* Bakterien zu einem physiologischen Auftreten von Nekrose in einem natürlichen System führt: Ohne Apoptose zu blockieren, kann man bereits 4-6 Stunden nach Infektion Zelltod durch Nekrose nachweisen. Dies konnte sowohl *in vitro* (Abbildung 1B) als auch *in vivo* beobachtet werden (Kirschnek et al., 2004). In der Auseinandersetzung des angeborenen Immunsystems mit diesen niedrig pathogenen *E.coli* Bakterien, aber auch anderen Spezies wie *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* und *Enterococcus faecalis* (Kirschnek et al., 2004), stellt somit das Auftreten von Nekrose in Phagozyten einen Prozess dar, der möglicherweise häufig im Rahmen einer Immunantwort auf bakterielle Infektionen abläuft.

Die Bedeutung dieser früh auftretenden Nekrose wird im Folgenden diskutiert. Denn klar ist, dass die Form des Zelltods Auswirkungen auf die Entwicklung einer Immunantwort hat – die verschiedenen Zelltodformen somit das Milieu in einem Organismus entscheidend beeinflussen können.

2. Aufnahme toter Zellen durch Phagozyten

Während die Phagozytose apoptotischer Zellen samt beteiligter Rezeptoren bereits genau untersucht worden ist, weiß man bis heute wenig über die Effektivität und den Mechanismus der Aufnahme nekrotischer Zellen durch Phagozyten.

2.1 Zelltod durch Nekrose ist ausreichend für eine schnelle und effektive Aufnahme durch phagozytierende Zellen

Unser System, in dem nach Koinkubation von *E.coli* Bakterien mit Makrophagen sowohl nekrotischer als auch apoptotischer Zelltod nebeneinander auftritt, bietet eine gute Möglichkeit, die Auswirkung beider Zelltodformen auf die Aufnahme der toten Zellen durch professionelle Phagozyten zu untersuchen.

Hierbei konnten wir feststellen, dass sich während einer zweistündigen Koinkubation die Aufnahme der überwiegend nekrotischen Zellpopulation acht Stunden nach Bakterienkontakt vergleichbar effektiv wie die der gemischt apoptotisch-nekrotischen Population nach 22 Stunden darstellte (siehe Punkt 2.2.2, Abbildung 10A). Ähnliches gilt für Situationen, in denen Apoptose durch den Pancaspaseninhibitor z-VAD.fmk, Überexpression von Bcl-2 oder Verwendung hitzeinaktivierter Bakterien blockiert wurde (Abbildung 10C und D). Die typischen Veränderungen auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen (siehe Einleitung) scheinen somit nicht Voraussetzung für eine schnelle Beseitigung toter Zellen zu sein, vielmehr werden auch nekrotische Zellen vergleichbar effektiv von dendritischen Zellen phagozytiert. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit Untersuchungen von Brouckaert et al., in denen die Phagozytose nekrotischer Zellen als weniger effizient und eine längere Zeitspanne beanspruchend charakterisiert wird (Brouckaert et al., 2004). Es lässt sich in unserem System nicht ausschließen, dass bei kürzerer Koinkubationszeit apoptotische Zellen einen Phagozytose-Vorteil haben. Nach zweistündigem Kontakt kann man hier jedoch keinen relevanten Unterschied in der Aufnahme der toten Zellen feststellen. Zumindest im „Endprodukt“ nach ausreichend langem Kontakt zwischen Phagozyt und toter Zelle lässt sich bei uns somit keine relevante Auswirkung der Zelltodform auf die Effektivität der Aufnahme beobachten.

Die Induktion von Nekrose in Makrophagen nach Kontakt zu *E.coli* Bakterien ist ein Prozess, der sehr viel früher auftritt (bereits nach sechs bis acht Stunden) als das erste Erscheinen apoptotischer Zellen. Trotzdem scheint der nekrotische Zelltod nicht mit der Funktion der Makrophagen zu interferieren: Die intrazelluläre Zersetzung der phagozytierten Bakterien ist schon nach zwei bis vier Stunden abgeschlossen (Hacker et al., 2002). Der nekrotische Zelltod in Phagozyten tritt also zu einem frühestmöglichen Zeitpunkt nach erfüllter Funktion - hier der Verdau der Bakterien - auf. Die Bedeutung dieser früh auftretenden Nekrose könnte nun darin liegen, dass es zu einer maximal schnellen Phagozytose durch dendritische Zellen und somit Weiterreichung der bakteriellen Antigene zur Entwicklung einer spezifischen Immunantwort kommen kann.

2.2 Mechanismus der Phagozytose nekrotischer Zellen

Wie genau nekrotische Zellen von Phagozyten aufgenommen werden, ist nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass dieser Prozess ähnlich dem bei der Phagozytose apoptotischer Zellen ist, zumindest werden in *C.elegans* die gleichen Gene für die Aufnahme apoptotischer und nekrotischer Zellen benötigt (Chung et al., 2000).

2.2.1 Phosphatidylserinexposition auf nekrotischen Zellen?

Die Exposition von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen spielt eine große Rolle bei der spezifischen Aufnahme dieser Zellen durch professionelle Phagozyten (siehe Einleitung, Punkt 2.1.1). Ob auch nekrotische Zellen über Phosphatidylserin bzw. den Phosphatidylserin-Rezeptor aufgenommen werden, ist bis jetzt nicht genau geklärt, erste Versuche weisen darauf hin (Brouckaert et al., 2004). In unseren Untersuchungen wiesen RAW Makrophagen sechs Stunden nach Bakterienkontakt eine eindeutige Bindung von Annexin V, einem natürlichen Bindungspartner von Phosphatidylserin, auf. Es kann aber nicht genau geklärt werden, ob dies eine echte Exposition von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der toten Zellen darstellt, wie sie in der Apoptose durch eine Aktivierung der Phospholipid-Skrablase und eine Inaktivierung der Aminphospholipid-Translokase erreicht wird (Frasch et al., 2000; Verhoven et al., 1999). Denkbar ist auch, dass Annexin V nicht-spezifisch an die Plasmamembran der toten Zellen bindet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch den Verlust der Integrität der Plasmamembran zu einem frühen Zeitpunkt Annexin V in die Zellen gelangen kann und an der Innenseite der Membran bindet.

Eine derartige Beteiligung von Phosphatidylserin an der Aufnahme nekrotischer Zellen kollidiert jedoch mit der Annahme, dass über Phosphatidylserin und Ligation des Phosphatidylserin-Rezeptors Entzündungsreaktionen und die Entwicklung einer Immunantwort unterdrückt werden (siehe Einleitung, Punkt 2.1.1), Zelltod durch Nekrose jedoch wahrscheinlich genau diese Reaktionen triggert. Es sind verschiedene Erklärungen denkbar, wie nekrotische Zellen einer eigentlich entzündungshemmenden Wirkung der Phosphatidylserinexposition entgegenwirken können: Zum eine könnten zytoplasmatische Proteine wie Annexine die

Bindungsstelle des Phosphatidylserins blockieren und somit eine Interaktion mit dem Phosphatidylserinrezeptor verhindern. Dieser Effekt kann zumindest durch externe Zugabe von Annexin V erreicht werden (Krahling et al., 1999). Ein anderer denkbarer Mechanismus wäre die Beteiligung von primär intrazellulären Proteasen am Abbau des Phosphatidylserinrezeptors. Derartige Proteasen aus Zell-Lysaten könnten den PSR spalten, seine antiinflammatorische Wirkung würde dadurch beseitigt werden. Unterstützend für diese Hypothese sind Beobachtungen, nach denen in entzündlichen Bezirken mit hohen Konzentrationen von Proteasen die Beseitigung apoptotischer Zellen gestört ist (Henson et al., 2001). Ein pathophysiologisches Beispiel dafür stellen die Atemwege eines Patienten mit zystischer Fibrose dar: Hier finden sich hohe Mengen an Neutrophiler Elastase (Birrer et al., 1994), es kommt zu einer gestörten Aufnahme von apoptotischen neutrophilen Granulozyten und einer heftigen Entzündungsreaktion. Flüssigkeit, die aus den Atemwegen per Lavage gewonnen wird, besitzt die Kapazität, den Phosphatidylserinrezeptor *in vitro* zu spalten (Henson et al., 2001). Als dritte Möglichkeit könnte stimulatorisches Material wie zum Beispiel Hitze Schock Proteine oder Doppelstrang-DNA aus den lysierenden nekrotischen Zellen freigesetzt werden und die antiinflammatorische Wirkung des Phosphatidylserins kompensieren.

Eine Beteiligung von Phosphatidylserin an der Aufnahme nekrotischer Zellen scheint somit denkbar – Einsichten über genauere Mechanismen bedürfen aber noch weiterer Untersuchungen.

2.2.2 Rolle von MFG-E8 für die Aufnahme nekrotischer Zellen durch Makrophagen

Milch-Fett-Globulin-EGF-Faktor 8 (MFG-E8), der von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird, wurde als Faktor identifiziert, über den Phagozyten an apoptotische Zellen bei der Aufnahme binden (Hanayama et al., 2002). MFG-E8 dient dabei als Brückenmolekül zwischen Phosphatidylserin auf der Seite der apoptotischen Zelle und Integrinen, vor allem dem $\alpha\beta3$ Integrin, auf der Seite der Phagozyten. Bei MFG-E8 dominant-negativen Peritonealmakrophagen konnte dabei die Phagozytose apoptotischer Zellen *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden.

Während viele Makrophagen und auch dendritische Zellen MFG-E8 sezernieren, konnte in der Mausmakrophagenzelllinie J774 nur eine sehr geringe Menge an MFG-E8 mRNA detektiert werden (Hanayama et al., 2002). Bei Koinkubation von J774 Zellen mit nekrotischen Makrophagen sechs Stunden nach Bakterienexposition kommt es jedoch trotzdem zu einer effektiven Phagozytose der Zellen (siehe Abschnitt 2.2, Abbildung 15). Eine größere Menge an MFG-E8 scheint somit nicht essentiell notwendig für die Aufnahme nekrotischer Zellen zu sein.

3. Auswirkung des Bakterien-induzierten Zelltods in Makrophagen auf die Entwicklung einer anti-bakteriellen Immunantwort

3.1. Der Zelltod der Makrophagen führt zur Aufnahme des bakteriellen Antigens durch dendritische Zellen

Obwohl der Verdauung der Bakterien durch Makrophagen nach Phagozytose noch erfolgreich stattfindet, stirbt ein Teil der Zellen bereits vier bis sechs Stunden nach Bakterienkontakt. Wie bereits unter Punkt 2.1 besprochen, könnte die Bedeutung dieses frühen Zelltods in der schnellen Aufnahme durch dendritische Zellen liegen. Unterstrichen wird diese Hypothese, wenn man die Rollen, die die einzelnen Zellen im Rahmen einer Immunantwort spielen, näher betrachtet:

Zwar sind wahrscheinlich dendritische Zellen nicht die einzige Zellform, die prinzipiell zur Kreuz-Präsentation fähig sind. Hierzu zählen auch Makrophagen (Kovacsovic-Bankowski et al., 1993; Rock et al., 1990) B-Zellen (Ke and Kapp, 1996) und Endothelzellen wie zum Beispiel sinusoidale Leberendothelzellen (Limmer et al., 2000). Es häufen sich jedoch die Hinweise darauf, dass die Kapazität und Effektivität der anderen Zellen – wie zum Beispiel der Makrophagen – in dieser Hinsicht stark beschränkt ist.

Im Gegensatz zu Dendritischen Zellen zeigte sich, dass Influenza-infizierte Monozyten nur schlechte Stimulatoren einer zytotoxischen T-Lymphozyten-Antwort sind (Bhardwaj et al., 1994). Dies mag zum Teil daran liegen, dass häufig nur ein kleiner Prozentsatz (zum Teil weniger als 5%) der Makrophagen zur Kreuz-Präsentation fähig ist (Norbury et al., 1995; Rock et al., 1990). Unter diversen Umständen erscheinen Makrophagen sogar die Fähigkeit zur Kreuz-Präsentation zu fehlen: So wird lösliches Ova-Antigen von Dendritischen Zellen, aber nicht von

Makrophagen auf MHC Klasse I präsentiert (Mitchell et al., 1998). Obwohl sich Makrophagen effizient in der Aufnahme apoptotischer Zellen erwiesen, konnten Albert et al. keine Generierung von Peptid-MHC I Komplexen beobachten – die Makrophagen behinderten sogar die Fähigkeit der gleichzeitig anwesenden dendritischen Zellen zur Kreuz-Präsentation (Albert et al., 1998b).

Die Rolle von Makrophagen bei der Kreuz-Präsentation von Antigenen bleibt somit unklar.

Dendritische Zellen dagegen scheinen diese Fähigkeit in hohem Maß zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass nach einer in vivo Deletion von Dendritischen Zellen die Kreuz-Präsentation von Antigenen im Rahmen einer *Listeria monocytogenes* - oder *Plasmodium yoelii* – Infektion nicht mehr möglich ist (Jung et al., 2002). Wichtig ist auch die Eigenschaft dendritischer Zellen, nach Phagozytose von Antigenen in drainierende Lymphknoten zu wandern (Heath et al., 2004). Dieser Prozess erhöht die Chance, auf geeignete CD4 und CD8 T-Zellen zu treffen, die sich vor allem in diesen lymphatischen Geweben befinden (Austyn and Larsen, 1990). Außerdem scheinen dendritische Zellen der einzige Zelltyp zu sein, der naive, ruhende T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Effektor-T-Lymphozyten aktivieren kann (Itano and Jenkins, 2003). Im Gegensatz zu Makrophagen konnten dendritische Zellen Antigen aus aufgenommenen apoptotischen Zellen kreuz-präsentieren und dabei zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren (Albert et al., 1998b). Kennzeichnend ist die hohe Potenz dendritischer Zellen, T-Zellen zu stimulieren: Es sind nur wenige dendritische Zellen und eine niedrige Menge an Antigen notwendig (in manchen Fällen reichen picomolare und nanomolare Antigenkonzentrationen, siehe Sallusto et al., 1995), um eine starke T-Zell-Antwort auszulösen (Banchereau and Steinman, 1998): In einer gemischten Leukozyten-Reaktion zwischen einem potentiellen Transplantat-Donator und den T-Zellen des Empfängers kann eine einzige dendritische Zelle 100-3000 T-Zellen aktivieren. All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass dendritische Zellen eine einzigartige Rolle in der Kreuz-Präsentation und Einleitung einer Immunantwort einnehmen.

In unserem System stehen nun zwar die Makrophagen in der ersten Reihe der Abwehr von Bakterien. Durch deren schnellen Zelltod und die effektive Aufnahme durch dendritische Zellen, wird primär in den Makrophagen enthaltenes bakterielles Antigen jedoch rasch an die dendritischen Zellen weitergereicht, und somit werden optimale Bedingungen für die Entwicklung einer antibakteriellen Immunantwort

geschaffen. Dies führt dann auch zu einer erfolgreichen Präsentation von in den Makrophagen enthaltenen Antigenen an T-Zellen (siehe Punkt 4, Abbildung 20A).

3.2 Reifungszustand der dendritischen Zellen nach Aufnahme

3.2.1 Der nekrotische Zelltod könnte die Entwicklung einer antibakteriellen Immunantwort unterstützen

Dendritische Zellen nehmen eine einzigartige Schlüsselstellung in der Entwicklung einer Immunantwort ein, da sie nicht nur eine Immunantwort gegen spezielle Antigene induzieren, sondern auch das Immunsystem so konditionieren können, dass es diese Antigene toleriert (Banchereau and Steinman, 1998). Dass apoptotische Zellen ohne eine Entzündungs- oder Immunreaktion beseitigt werden, nekrotische Zellen jedoch gerade derartige Reaktionen hervorrufen, stellt eine vielfach vertretene Position dar (siehe Einleitung, Punkt 3.2.2).

In einigen Fällen führte jedoch eine Aufnahme von Antigenen aus nekrotischen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen nicht zu einer effektiven Antigenpräsentation auf MHC I (siehe Einleitung, Punkt 3.2.2). Dies könnte zumindest in einigen Fällen dadurch erklärbar sein, dass die dendritischen Zellen in Anwesenheit der nekrotischen Zellen reifen und somit nicht mehr effektiv phagozytieren können (siehe auch Larsson et al., 2001). Ein derartiger Effekt konnte in unseren Versuchen jedoch ausgeschlossen werden: Die nekrotischen Makrophagen wurden effektiv von den dendritischen Zellen aufgenommen, so dass eine Behinderung dieses Prozesses mit Auswirkung auf eine erfolgreiche Kreuz-Präsentation ausgeschlossen werden kann. Ganz im Gegenteil: Der nekrotische Zelltod erscheint in unserem System sogar förderlich, da er durch Reifung der dendritischen Zellen nach Aufnahme sogar zu einer effektiveren Induktion einer Immunantwort führen könnte (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000). Als mögliche Mediatoren, die aus nekrotischen Zellen freigesetzt werden können, kommen dabei Proteine wie Hitze-Schock-Proteine (Somersan et al., 2001) oder HMGB1 (Scaffidi et al., 2002) und zelluläre DNA (Ishii et al., 2001) in Frage (siehe auch Einleitung, Punkt 3.2.2).

Grundsätzlich müssen derartige Experimente jedoch immer kritisch betrachtet werden: Bei Koinkubation von dendritischen Zellen mit apoptotischen und nekrotischen Zellen konnten in Versuchen von Salio et al. nur diejenigen eine

Reifung von dendritischen Zellen bewirken, die mit Mykoplasmen kontaminiert waren (Salio et al., 2000). Eine Infektion unserer RAW Makrophagen mit Mykoplasmen konnten wir jedoch ausschließen.

Unsere Daten weisen darauf hin, dass der durch Bakterien induzierte nekrotische Zelltod Teil der zellulären Antwort in Makrophagen auf Kontakt zu Bakterien oder bakteriellen Komponenten ist. Durch die schnelle effektive Aufnahme durch dendritische Zellen ist gewährleistet, dass die Antigene in potente Antigen-präsentierende Zellen gelangen, um eine spezifische erworbene Immunantwort einleiten zu können. Der Prozess der Nekrose könnte dabei durch raschere Aufnahme wegen dieses früher auftretenden Zelltods und durch Unterstützung der Reifung der dendritischen Zellen positive Signale für die Entwicklung einer Immunantwort liefern.

3.2.2 Der Prozess der Aktivierung vor Apoptoseinduktion trägt zur Reifung der dendritischen Zellen bei

Auch wenn der Zelltod durch Nekrose in Makrophagen wohl bereits einen immunstimulatorischen Faktor darstellt, so trägt sicherlich auch die Anwesenheit der Bakterien zu der Reifungsinduktion der dendritischen Zellen bei. Unter Verwendung der Zelllinie RAW K14 haben wir nun die Möglichkeit, die Auswirkung einer isolierten Toll-like-Rezeptor-Aktivierung der Makrophagen vor der Zelltodinduktion auf die dendritischen Zellen zu untersuchen. Hierbei konnten wir feststellen, dass eine Koinkubation von aktivierten apoptotischen Makrophagen mit dendritischen Zellen auf diesen eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle bewirkt (siehe Punkt 3.1, Abbildung 17). Zur Erreichung eines derartigen Effekts reichte sogar schon der Überstand der voraktivierten, apoptotischen Makrophagen aus (siehe Punkt 3.2, Abbildung 18).

Welche Mediatoren zu dieser Reifung beitragen, ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Unwahrscheinlich erscheint nach unseren Versuchen ein wesentlicher Beitrag einer Sekretion von TNF (siehe Punkt 3.3, Abbildung 19).

Ein endogenes Gefahrensignal, das fähig ist, zur Reifung von dendritischen Zelle beizutragen und die Entwicklung einer CD8⁺ T-Zell-Antwort zu unterstützen, ist Harnsäure (Shi et al., 2003). Die Menge an intrazellulärer Harnsäure wird bei Induktion von Apoptose durch zum Beispiel Ultraviolett-Bestrahlung oder Behandlung

mit Cycloheximid oder Emetin erhöht. Bei Verletzung oder Lyse der Zellen entweicht die Harnsäure. Es ist nicht bekannt, ob diese unter bestimmten Bedingungen auch aus apoptotischen Zellen freigesetzt werden kann. Denkbar ist jedoch, dass dies bei Aktivierung der Zelle geschieht, um den Entzündungsprozess zu unterhalten.

Auch Hitze-Schock-Proteine, die zu den meist verbreiteten und bestkonservierten Molekülen in Säugetierzellen zählen, können die Expression antigenpräsentierender und kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen induzieren. Auch wenn es Hinweise darauf gibt, dass vor allem nekrotische, aber nicht apoptotische Zellen Hitze-Schock-Proteine wie gp96 oder hsp70 freisetzen (Basu et al., 2000; Somersan et al., 2001), so ist es jedoch auch denkbar, dass dies auch in aktivierten apoptotischen Zellen geschieht.

Die genaue Identifikation der Faktoren, die von sterbenden, aktivierten Zellen freigesetzt werden und die Entwicklung einer Immunantwort unterstützen, bedarf sicherlich noch weiterer Untersuchungen. Die Erkenntnis, dass eine Aktivierung von Zellen vor Apoptoseinduktion eine Reifung von dendritischen Zellen bewirken kann, deutet aber darauf hin, dass es nicht eine einfache Gleichsetzung des apoptotischen Zelltodes mit einer immunsuppressorischen Wirkung geben darf. Für unser Modell bedeutet dies, dass wahrscheinlich nicht nur die nekrotischen, sondern auch die aktivierten apoptotischen Makrophagen nach Aufnahme der *E.coli* Bakterien zur Reifung der dendritischen Zellen und somit einer effektiven Entwicklung einer antibakteriellen Immunantwort beitragen.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der bakterieninduzierte Zelltod in Phagozyten und dessen Auswirkung auf eine anti-bakterielle Immunantwort untersucht.

Der erste Teil der Arbeit widmete sich dem Zelltod in Makrophagen nach der Aufnahme von *E.coli* Bakterien. Hierbei zeigte sich, dass nach einem effektiven Verdau der Bakterien - bereits nach 4-6 Stunden - ein Teil der Phagozyten ihre Plasmamembran-Integrität verliert, ohne Hinweise auf apoptotischen Zelltod zu zeigen: Die Zellen sterben durch Nekrose. Erst nach 16-20 Stunden treten zusätzlich auch apoptotische Zellen auf. Nekrose tritt dabei unabhängig von Apoptose auf: Bei Verwendung hitzeinaktivierter Bakterien (die nicht mehr phagozytiert werden), Blockierung von Caspasen durch z-VAD.fmk oder Überexpression von Bcl-2 konnte zwar Apoptose blockiert werden, die Zellen starben aber dennoch durch Nekrose. Diese Form des Zelltods, die sonst oft nur unter extremen in vitro Bedingungen, bei schwerer Zell-Traumatisierung oder Blockierung von Apoptose auftritt, scheint somit ein relevanter Teil der zellulären Antwort von Phagozyten auf den Kontakt zu Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen zu sein.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung des nekrotischen Zelltods für eine Aufnahme der toten Zellen durch dendritische Zellen evaluiert. Hierbei konnten wir feststellen, dass der Zelltod durch Nekrose ausreichend ist für eine schnelle und effektive Aufnahme durch phagozytierende Zellen: Es konnten keine großen Diskrepanzen in der Effektivität der Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen festgestellt werden. Wie bereits für apoptotische Zellen bekannt, könnte auch bei der Aufnahme nekrotischer Zellen eine – wenn auch vielleicht nur passive – Exposition von Phosphatidylserin eine Rolle spielen.

Der früh auftretende nekrotische Zelltod führt somit zu einer schnellen Weitergabe von bakteriellen Antigenen an dendritische Zellen. Diese nehmen eine Schlüsselstellung im Immunsystem ein, da sie sowohl Toleranz als auch die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort induzieren können. Diese Entscheidung kann durch die Form des Zelltodes beeinflusst werden: Während nekrotischen Zellen eine immunstimulatorische Wirkung zugeschrieben wird, gelten apoptotische Zellen eher als antiinflammatorisch. Im dritten Teil dieser Arbeit konnten wir jedoch feststellen, dass auch aktivierte apoptotische Zellen zu einer Reifung von

dendritischen Zellen beitragen können. Dies geschieht durch einen oder mehrere lösliche Faktor(en), die jedoch noch identifiziert werden müssen.

Reife dendritische Zellen können phagozytiertes Material effektiv an ihrer Oberfläche präsentieren. Im vierten Teil der Arbeit konnte diese einzigartige Fähigkeit der dendritischen Zellen zur Kreuz-Präsentation bestätigt werden: Antigen, das aus phagozytierten toten Makrophagen stammt, wurde erfolgreich von dendritischen Zellen an T-Zellen präsentiert.

Die Kombination aus nekrotischen und aktivierten apoptotischen Makrophagen nach Aufnahme von Bakterien scheint somit einen starken Stimulus für die aufnehmenden dendritischen Zellen zur Einleitung einer spezifischen Immunantwort darzustellen. Die vorliegende Arbeit weist somit dem Zelltod nach Phagozytose von Bakterien eine relevante Funktion in der Modulation einer Immunantwort zu.

VI. Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. L., and Cresswell, P. (2003). Regulation of MHC class I transport in human dendritic cells and the dendritic-like cell line KG-1. *J Immunol* 170, 4178-4188.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12889-12894.
- Adamec, E., Mohan, P. S., Cataldo, A. M., Vonsattel, J. P., and Nixon, R. A. (2000). Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 100, 663-675.
- Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., *et al.* (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713-717.
- Albert, M. L., Kim, J. I., and Birge, R. B. (2000). α 5 β 1 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2, 899-905.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via α 5 β 1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.
- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., and Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 150, 5080-5085.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.
- Austyn, J. M., and Larsen, C. P. (1990). Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation* 49, 1-7.
- Balasubramanian, K., Chandra, J., and Schroit, A. J. (1997). Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J Biol Chem* 272, 31113-31117.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baran, J., Guzik, K., Hryniewicz, W., Ernst, M., Flad, H. D., and Pryjma, J. (1996). Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* 64, 4242-4248.

Barkla, D. H., and Gibson, P. R. (1999). The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 31, 230-238.

Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., and Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14, 303-313.

Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12, 1539-1546.

Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C., and Sacks, D. (2002). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168, 3992-4000.

Bellmann, K., Jaattela, M., Wissing, D., Burkart, V., and Kolb, H. (1996). Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 391, 185-188.

Bellone, M. (2000). Apoptosis, cross-presentation, and the fate of the antigen specific immune response. *Apoptosis* 5, 307-314.

Bevers, 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, 317-330.

Bhardwaj, N., Bender, A., Gonzalez, N., Bui, L. K., Garrett, M. C., and Steinman, R. M. (1994). Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest* 94, 797-807.

Binder, R. J., Han, D. K., and Srivastava, P. K. (2000). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol* 1, 151-155.

Birrer, P., McElvaney, N. G., Rudeberg, A., Sommer, C. W., Liechti-Gallati, S., Kraemer, R., Hubbard, R., and Crystal, R. G. (1994). Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 207-213.

Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H., and Lotz, M. (1995). Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146, 75-85.

Blom, W. M., De Bont, H. J., Meijerman, I., Kuppen, P. J., Mulder, G. J., and Nagelkerke, J. F. (1999). Interleukin-2-activated natural killer cells can induce both apoptosis and necrosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 29, 785-792.

Boise, L. H., and Collins, C. M. (2001). Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol* 9, 64-67.

Boone, E., Vanden Berghe, T., Van Loo, G., De Wilde, G., De Wael, N., Vercammen, D., Fiers, W., Haegeman, G., and Vandenabeele, P. (2000). Structure/Function

- analysis of p55 tumor necrosis factor receptor and fas-associated death domain. Effect on necrosis in L929sA cells. *J Biol Chem* 275, 37596-37603.
- Borthwick, N. J., Wickremasinghe, R. G., Lewin, J., Fairbanks, L. D., and Bofill, M. (1999). Activation-associated necrosis in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 179, 352-360.
- Bose, J., Gruber, A. D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Kontgen, F., and Lengeling, A. (2004). The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* 3, 15.
- Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A. E., Thompson, E. M., Cook, H. T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P. P., and Walport, M. J. (1998). Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 19, 56-59.
- Bowness, P., Davies, K. A., Norsworthy, P. J., Athanassiou, P., Taylor-Wiedeman, J., Borysiewicz, L. K., Meyer, P. A., and Walport, M. J. (1994). Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *Qjm* 87, 455-464.
- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., and Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
- Brocheriou, V., Hagege, A. A., Oubenaissa, A., Lambert, M., Mallet, V. O., Duriez, M., Wassef, M., Kahn, A., Menasche, P., and Gilgenkrantz, H. (2000). Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med* 2, 326-333.
- Brode, S., and Macary, P. A. (2004). Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* 112, 345-351.
- Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D. V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, Haegeman, G., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2004). Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 15, 1089-1100.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *AnnuRevCell DevBiol* 15:269-90, 269-290.
- Burkart, V., Liu, H., Bellmann, K., Wissing, D., Jaattela, M., Cavallo, M. G., Pozzilli, P., Briviba, K., and Kolb, H. (2000). Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem* 275, 19521-19528.
- Casciola Rosen, L. A., Anhalt, G. J., and Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *JExpMed* 182, 1625-1634.

- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179, 1317-1330.
- Casiano, C. A., Martin, S. J., Green, D. R., and Tan, E. M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO- 1)- mediated T cell apoptosis. *JExpMed* 184, 765-770.
- Chan, F. K., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M. J. (2003). A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* 278, 51613-51621.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase- independent pathway. *CurrBiol* 9, 967-970.
- Chen, Y., Smith, M. R., Thirumalai, K., and Zychlinsky, A. (1996). A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J* 15, 3853-3860.
- Chiodoni, C., Paglia, P., Stoppacciaro, A., Rodolfo, M., Parenza, M., and Colombo, M. P. (1999). Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 190, 125-133.
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23, 1261-1276.
- Chung, S., Gumienny, T. L., Hengartner, M. O., and Driscoll, M. (2000). A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. *NatCell Biol* 2, 931-937.
- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *NatRevCancer* 2, 647-656.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 172, 21-28.
- Daleke, D. L., and Lyles, J. V. (2000). Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 1486, 108-127.
- den Haan, J. M., and Bevan, M. J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196, 817-827.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Denault, J. B., and Salvesen, G. S. (2002). Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102, 4489-4500.
- Denecker, G., Vercammen, D., Steemans, M., Vanden Berghe, T., Brouckaert, G., Van Loo, G., Zhivotovsky, B., Fiers, W., Grooten, J., Declercq, W., and

- Vandenabeele, P. (2001). Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* 8, 829-840.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *AmJPathol* 151, 1205-1213.
- Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56, 351-358.
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.
- Ehlers, S., Benini, J., Kutsch, S., Endres, R., Rietschel, E. T., and Pfeffer, K. (1999). Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 67, 3571-3579.
- Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., and Dawson, V. L. (1997). Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *NatMed* 3, 1089-1095.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L., and Henson, P. M. (2001a). Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 166, 6847-6854.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (2001b). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108, 957-962.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.
- Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., and Bratton, D. L. (2001c). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 1071-1077.
- Faraco, P. R., Ledgerwood, E. C., Vandenabeele, P., Prins, J. B., and Bradley, J. R. (1999). Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 385-392.

- Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-263.
- Francois, M., Le Cabec, V., Dupont, M. A., Sansonetti, P. J., and Maridonneau-Parini, I. (2000). Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* 68, 1289-1296.
- Frank, A., Rauen, U., and de Groot, H. (2000). Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *JHepatol* 32, 58-66.
- Frasch, S. C., Henson, P. M., Kailey, J. M., Richter, D. A., Janes, M. S., Fadok, V. A., and Bratton, D. L. (2000). Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 275, 23065-23073.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Wei, J. Y., Mosser, D. D., and Sherman, M. Y. (2000). Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation. *J Biol Chem* 275, 38088-38094.
- Galan, A., Garcia-Bermejo, M. L., Troyano, A., Vilaboa, N. E., de Blas, E., Kazanietz, M. G., and Aller, P. (2000). Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 275, 11418-11424.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *NatMed* 5, 1249-1255.
- Gardai, S. J., Xiao, Y. Q., Dickinson, M., Nick, J. A., Voelker, D. R., Greene, K. E., and Henson, P. M. (2003). By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115, 13-23.
- Genini, D., Budihardjo, I., Plunkett, W., Wang, X., Carrera, C. J., Cottam, H. B., Carson, D. A., and Leoni, L. M. (2000). Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J Biol Chem* 275, 29-34.
- 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, 1353-1364.
- Glazner, G. W., Chan, S. L., Lu, C., and Mattson, M. P. (2000). Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis. *J Neurosci* 20, 3641-3649.
- Guerder, S., and Matzinger, P. (1992). A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med* 176, 553-564.

- Guermouprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402.
- Guimaraes, C. P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2004). Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1689**, 235-243.
- Haase, R., Kirschning, C. J., Sing, A., Schrottner, P., Fukase, K., Kusumoto, S., Wagner, H., Heesemann, J., and Ruckdeschel, K. (2003). A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* **171**, 4294-4303.
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**, 5-17.
- Hacker, H., Furmann, C., Wagner, H., and Hacker, G. (2002). Caspase-9/-3 Activation and Apoptosis Are Induced in Mouse Macrophages upon Ingestion and Digestion of Escherichia coli Bacteria. *J Immunol* **169**, 3172-3179.
- Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M. F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J. M., Devaux, P. F., McNeish, J., Marguet, D., and Chimini, G. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* **2**, 399-406.
- Hampton, M. B., and Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* **414**, 552-556.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182-187.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A., and Barratt-Boyes, S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* **166**, 3717-3723.
- Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C., and Barratt-Boyes, S. M. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* **170**, 2302-2309.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* **199**, 9-26.
- Henkart, P. A. (1996). ICE family proteases: Mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* **4**, 195-201.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., and Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 627-633.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative,

- caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- 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.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178, 479-488.
- Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., *et al.* (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 188, 2163-2173.
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., *et al.* (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180, 1849-1860.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D., and Klinman, D. M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 167, 2602-2607.
- Ishimoto, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., and Nakano, T. (2000). Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem (Tokyo)* 127, 411-417.
- Ismaili, J., Rennesson, J., Aksoy, E., Vekemans, J., Vincart, B., Amraoui, Z., Van Laethem, F., Goldman, M., and Dubois, P. M. (2002). Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* 168, 926-932.
- Itano, A. A., and Jenkins, M. K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4, 733-739.
- Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248, 30-43.
- Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y., and Platt, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168, 5233-5239.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c(+)

- dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.
- Kabakov, A. E., and Gabai, V. L. (1994). Heat-shock proteins maintain the viability of ATP-deprived cells: what is the mechanism? *Trends Cell Biol* 4, 193-196.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6020-6024.
- Ke, Y., and Kapp, J. A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 184, 1179-1184.
- Kim, J. W., Won, J., Sohn, S., and Joe, C. O. (2000). DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly(ADP-ribose) polymerase is required for UV mediated apoptosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 6), 955-961.
- Kirschnek, S., Scheffel, J., Heinzmann, U., and Hacker, G. (2004). Necrosis-like cell death induced by bacteria in mouse macrophages. *Eur J Immunol* 34, 1461-1471.
- Kirschnek, S., Ying, S., Fischer, S. F., Hacker, H., Villunger, A., Hochrein, H., and Hacker, G. (2005). Phagocytosis-induced apoptosis in macrophages is mediated by up-regulation and activation of the Bcl-2 homology domain 3-only protein Bim. *J Immunol* 174, 671-679.
- Kitajima, T., Ariizumi, K., Bergstresser, P. R., and Takashima, A. (1996). A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest* 98, 142-147.
- Kohli, V., Madden, J. F., Bentley, R. C., and Clavien, P. A. (1999). Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 116, 168-178.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., and Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4942-4946.
- Koyasu, S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4, 313-319.
- Krahling, S., Callahan, M. K., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1999). Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ* 6, 183-189.

Lakics, V., and Vogel, S. N. (1998). Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. *J Immunol* 161, 2490-2500.

Lankiewicz, S., Marc Luetjens, C., Truc Bui, N., Krohn, A. J., Poppe, M., Cole, G. M., Saido, T. C., and Prehn, J. H. (2000). Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 275, 17064-17071.

Larsson, M., Fonteneau, J. F., Somersan, S., Sanders, C., Bickham, K., Thomas, E. K., Mahnke, K., and Bhardwaj, N. (2001). Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3432-3442.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *JExpMed* 185, 1481-1486.

Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1999). Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent steps upstream and downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 215-221.

Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R. M., and Beg, A. A. (2001). An essential role of the nf-kappab/toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 166, 7128-7135.

Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P., and Flavell, R. A. (2003). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302, 1560-1563.

Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P. A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-1354.

Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1998). Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium* 23, 165-171.

Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *JExpMed* 196, 1091-1097.

Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445-449.

Ma, X. L., Kumar, S., Gao, F., Loudon, C. S., Lopez, B. L., Christopher, T. A., Wang, C., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z., and Yue, T. L. (1999). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 99, 1685-1691.

Malis, C. D., and Bonventre, J. V. (1988). Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implications for ischemic and toxic tissue damage. *Prog Clin Biol Res* 282, 235-259.

Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* *284*, 651-654.

Marguet, D., Luciani, M. F., Moynault, A., Williamson, P., and Chimini, G. (1999). Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat Cell Biol* *1*, 454-456.

Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2000). Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *JCell Biol* *151*, 1247-1256.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* *12*, 991-1045.

Mayhew, T. M., Myklebust, R., Whybrow, A., and Jenkins, R. (1999). Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol Histopathol* *14*, 257-267.

Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Thiers, J. C., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1999). Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *Faseb J* *13*, 485-494.

Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M., and Vile, R. G. (1998). Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* *4*, 581-587.

Melino, G., Bernassola, F., Catani, M. V., Rossi, A., Corazzari, M., Sabatini, S., Vilbois, F., and Green, D. R. (2000). Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res* *60*, 2377-2383.

Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* *12*, 575-625.

Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* *195*, 15-21.

Mevorach, D., Zhou, J. L., Song, X., and Elkon, K. B. (1998). Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* *188*, 387-392.

Mitchell, D. A., Nair, S. K., and Gilboa, E. (1998). Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol* *28*, 1923-1933.

Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M., and Nagata, S. (2004). Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *Eur J Immunol* *34*, 1414-1422.

Mochizuki, T., Asai, A., Saito, N., Tanaka, S., Katagiri, H., Asano, T., Nakane, M., Tamura, A., Kuchino, Y., Kitanaka, C., and Kirino, T. (2002). Akt protein kinase

inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* 277, 2790-2797.

Monack, D. M., Meccas, J., Ghori, N., and Falkow, S. (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10385-10390.

Murdoch, W. J. (1999). Plasmin-tumour necrosis factor interaction in the ovulatory process. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 353-358.

Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., and Arita, H. (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272, 29411-29414.

Nauta, A. J., Daha, M. R., van Kooten, C., and Roos, A. (2003a). Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol* 24, 148-154.

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, 2853-2863.

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, 1726-1736.

Navarre, W. W., and Zychlinsky, A. (2000). Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2, 265-273.

Nicotera, P., Leist, M., and Manzo, L. (1999). Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20, 46-51.

Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1999). Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 583-591.

Norbury, C. C., Hewlett, L. J., Prescott, A. R., Shastri, N., and Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3, 783-791.

Ogasawara, J., Watanabe Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809.

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, 781-795.

- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.
- Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., and Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9535-9540.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 10229-10233.
- Oppenheim, R. W., Flavell, R. A., Vinsant, S., Prevette, D., Kuan, C. Y., and Rakic, P. (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21, 4752-4760.
- Palomba, L., Sestili, P., Columbaro, M., Falcieri, E., and Cantoni, O. (1999). Apoptosis and necrosis following exposure of U937 cells to increasing concentrations of hydrogen peroxide: the effect of the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Biochem Pharmacol* 58, 1743-1750.
- Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., and Harding, C. V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.
- Phillips, R. G., Lawrence, M. S., Ho, D. Y., and Sapolsky, R. M. (2000). Limitations in the neuroprotective potential of gene therapy with Bcl-2. *Brain Res* 859, 202-206.
- Plumier, J. C., Ross, B. M., Currie, R. W., Angelidis, C. E., Kazlaris, H., Kollias, G., and Pagoulatos, G. N. (1995). Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 95, 1854-1860.
- Plymale, D. R., Tang, D. S., Comardelle, A. M., Fermin, C. D., Lewis, D. E., and Garry, R. F. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1-induced killing of CD4 cells. *Aids* 13, 1827-1839.
- Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.
- Price, D. L., Sisodia, S. S., and Borchelt, D. R. (1998). Genetic neurodegenerative diseases: the human illness and transgenic models. *Science* 282, 1079-1083.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., and Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283, 1-16.
- Punn, A., Mockridge, J. W., Farooqui, S., Marber, M. S., and Heads, R. J. (2000). Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem J* 350 Pt 3, 891-899.

- Ramirez, M. C., and Sigal, L. J. (2002). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* 169, 6733-6742.
- Reis e Sousa, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14, 495-498.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., and Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178, 509-519.
- Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *JExpMed* 181, 1857-1862.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Rock, K. L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921.
- Rodriguez, A., Oliver, H., Zou, H., Chen, P., Wang, X., and Abrams, J. M. (1999). Dark is a Drosophila homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *NatCell Biol* 1, 272-279.
- Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P., Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163, 130-136.
- Roos, A., Xu, W., Castellano, G., Nauta, A. J., Garred, P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2004). Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol* 34, 921-929.
- Ruemmele, F. M., Dionne, S., Levy, E., and Seidman, E. G. (1999). TNFalpha-induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 159-166.
- Saelens, X., Festjens, N., Parthoens, E., Vanoverberghe, I., Kalai, M., van Kuppeveld, F., and Vandenabeele, P. (2005). Protein synthesis persists during necrotic cell death. *J Cell Biol* 168, 545-551.
- Saldeen, J. (2000). Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 141, 2003-2010.
- Salio, M., Cerundolo, V., and Lanzavecchia, A. (2000). Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells. *EurJ Immunol* 30, 705-708.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1999). Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 189, 611-614.
- Sambrano, G. R., and Steinberg, D. (1995). Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1396-1400.
- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Schagat, T. L., Wofford, J. A., and Wright, J. R. (2001). Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 166, 2727-2733.
- Scheffer, S. R., Nave, H., Korangy, F., Schlote, K., Pabst, R., Jaffee, E. M., Manns, M. P., and Greten, T. F. (2003). Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo. *Int J Cancer* 103, 205-211.
- Schulze-Lohoff, E., Hugo, C., Rost, S., Arnold, S., Gruber, A., Brune, B., and Sterzel, R. B. (1998). Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol* 275, F962-971.
- Schuurhuis, D. H., Laban, S., Toes, R. E., Ricciardi-Castagnoli, P., Kleijmeer, M. J., van der Voort, E. I., Rea, D., Offringa, R., Geuze, H. J., Melief, C. J., and Ossendorp, F. (2000). Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med* 192, 145-150.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425, 516-521.
- Shimizu, A., Masuda, Y., Kitamura, H., Ishizaki, M., Ohashi, R., Sugisaki, Y., and Yamanaka, N. (2000). Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis. *Nephron* 86, 152-160.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1996). Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* 12, 2045-2050.
- Simon, M. M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T. A., Jaattela, M., and Schwarz, T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response

to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 95, 926-933.

Sims, P. J., and Wiedmer, T. (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 86, 266-275.

Single, B., Leist, M., and Nicotera, P. (2001). Differential effects of bcl-2 on cell death triggered under ATP-depleting conditions. *Exp Cell Res* 262, 8-16.

Smiley, S. T., King, J. A., and Hancock, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167, 2887-2894.

Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167, 4844-4852.

Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2, 185-194.

Stach, C. M., Turnay, X., Voll, R. E., Kern, P. M., Kolowos, W., Beyer, T. D., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (2000). Treatment with annexin V increases immunogenicity of apoptotic human T-cells in Balb/c mice. *Cell Death Differ* 7, 911-915.

Stuart, L. M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168, 1627-1635.

Sugino, T., Nozaki, K., Takagi, Y., Hattori, I., Hashimoto, N., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. *J Neurosci* 20, 4506-4514.

Syntichaki, P., and Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3, 604-609.

Tashiro, K., Makita, Y., Shike, T., Shirato, I., Sato, T., Cynshi, O., and Tomino, Y. (1999). Detection of cell death of cultured mouse mesangial cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *Nephron* 82, 51-58.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Troyano, A., Fernandez, C., Sancho, P., de Blas, E., and Aller, P. (2001). Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. *J Biol Chem* 276, 47107-47115.

Tsukada, T., Watanabe, M., and Yamashima, T. (2001). Implications of CAD and DNase II in ischemic neuronal necrosis specific for the primate hippocampus. *J Neurochem* 79, 1196-1206.

Ueda, H., and Fujita, R. (2004). Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull* 27, 950-955.

- Vabulas, R. M., Wagner, H., and Schild, H. (2002). Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *CurrTopMicrobiolImmunol* 270:169-84., 169-184.
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998a). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J ExpMed* 187, 1477-1485.
- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de, C. M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998b). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *JExpMed* 188, 919-930.
- Vercammen, D., Vandenabeele, P., Beyaert, R., Declercq, W., and Fiers, W. (1997). Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 9, 801-808.
- Verhoven, B., Krahling, S., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1999). Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell DeathDiffer* 6, 262-270.
- Virag, L., and Szabo, C. (2000). BCL-2 protects peroxynitrite-treated thymocytes from poly(ADP-ribose) synthase (PARS)-independent apoptotic but not from PARS-mediated necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 29, 704-713.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C., and Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18-54.
- Warny, M., Keates, A. C., Keates, S., Castagliuolo, I., Zacks, J. K., Aboudola, S., Qamar, A., Pothoulakis, C., LaMont, J. T., and Kelly, C. P. (2000). p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest* 105, 1147-1156.
- Warny, M., and Kelly, C. P. (1999). Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am J Physiol* 276, C717-724.
- Watson, R. W., Redmond, H. P., Wang, J. H., Condrón, C., and Bouchier-Hayes, D. (1996). Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol* 156, 3986-3992.
- Wintrobe, M. M. (1983). Perspective in hematology. *Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med Soc* 46, 7-12.
- Wu, Y. C., and Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 93, 951-960.
- Wyllie, A. H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 153, 313-316.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., and Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.

Xu, K., Tavernarakis, N., and Driscoll, M. (2001). Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31, 957-971.

Yamashima, T. (2000). Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 62, 273-295.

Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633-642.

Yoshioka, A., Yamaya, Y., Saiki, S., Kanemoto, M., Hirose, G., Beesley, J., and Pleasure, D. (2000). Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors mediate oxygen-glucose deprivation-induced oligodendroglial injury. *Brain Res* 854, 207-215.

Yrlid, U., and Wick, M. J. (2000). Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. *J ExpMed* 191, 613-624.

Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L., Ma, X. L., Kumar, S., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z., Thomas, H., Maleeff, B., and Ohlstein, E. H. (2000). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* 86, 692-699.

Zaborina, O., Dhiman, N., Ling Chen, M., Kostal, J., Holder, I. A., and Chakrabarty, A. M. (2000). Secreted products of a nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain induce two modes of macrophage killing: external-ATP-dependent, P2Z-receptor-mediated necrosis and ATP-independent, caspase-mediated apoptosis. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2521-2530.

Zal, T., Volkmann, A., and Stockinger, B. (1994). Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *JExpMed* 180, 2089-2099.

Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18.

Zhao, X., Pike, B. R., Newcomb, J. K., Wang, K. K., Posmantur, R. M., and Hayes, R. L. (1999). Maitotoxin induces calpain but not caspase-3 activation and necrotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *Neurochem Res* 24, 371-382.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Häcker im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Georg Häcker für die Möglichkeit, unter seiner engagierten Betreuung an meiner Promotion zu arbeiten. Sein Ideenreichtum und seine Begeisterung für die Wissenschaft haben auch in mir die Neigung zur Forschung wecken können.

Ich danke Prof. Manfred Gratzl, dem Leiter des Graduiertenkollegs 333, und den Koordinatorinnen Dr. Martina Haasemann und Dr. Karin Schmidt-Bäse für die zahlreichen Erfahrungen, die ich im Rahmen des Graduiertenkollegs sammeln durfte.

Vielen herzlichen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe. In ihr fand ich nicht nur tatkräftige praktische und theoretische Unterstützung bei meiner Arbeit, sondern auch gute Freunde, die über so manche weniger erfolgreiche Versuchsreihen hinweg halfen. Danke Corina Anders, Anette Bauer, Svetla Chaneva, Silke Fischer, Tobias Frankenberg, Christine Fürmann, Monika Gerhard, Astrid Grundbrecher, Thomas Harlander, Christina Hilpert, Frederik Höfling, Johannes Holzapfel, Susanne Kirschnek, Michael Knese, Astrid Mack, Catharina Müller-Thomas, Marc Rehm, Stefan Schliep, Barbara Seiffert, Kathi Suttner, Juliane Vier, Songmin Ying.

Ich danke Sabrina für die immerwährende moralische Unterstützung und Melchior für die Anspornungen, diese Arbeit zu vollenden.

Besonders möchte ich mich bei meiner wunderbaren Familie bedanken, ohne deren ständige Unterstützung und Rückendeckung ich nicht wäre, wo ich jetzt bin. Vielen Dank für alles.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Scheffel
Vorname: Julia
Geburtsdatum: 01.06.1979
Geburtsort: Mühldorf

Ausbildung

Sept. 1985 – Juli 1989 Grundschule Kraiburg

Sept 1989 – Juni 1998 Ruperti-Gymnasium Waldkraiburg bzw. Mühldorf
mit Abiturabschluss

November 1998 – August 2000 Vorklinischer Abschnitt des Studiums der
Humanmedizin an der Technischen Universität
München mit Physikum im August 2000

Oktober 2000 – April 2004 Klinischer Abschnitt des Studiums der
Humanmedizin an der Technischen Universität
München mit erstem Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung im August 2001 und zweitem Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung im April 2004

April 2004 – August 2004 Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der
Pädiatrie im Kinderkrankenhaus München
Schwabing, infektiologische Station

August 2004 – Dezember 2004 Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der
Inneren Medizin des Klinikums rechts der Isar,
kardiologische Intensivstation und Allgemeinstation
der Gastroenterologie

Dezember 2004 – März 2005 Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der
Chirurgischen Abteilung des Kantonsspitals Luzern,
Schweiz

Mai 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

März 2001 Famulatur in der Inneren Medizin des
Kreiskrankenhauses Mühldorf

| | |
|----------------|---|
| September 2001 | Famulatur im Pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar, München |
| März 2002 | Famulatur im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München |
| August 2002 | Famulatur in der Psychiatrischen Klinik der Technischen Universität München, Abteilung Akutpsychiatrie |
| März 2003 | Famulatur in der Pädiatrie der Mount Sinai School of Medicine New York, USA, Abteilung pädiatrische Kardiologie |

Promotion

| | |
|-----------------|--|
| Seit Sept. 2001 | Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, Thema: „Die Bedeutung von Bakterien-induziertem Zelltod in Phagozyten für die Entwicklung einer antibakteriellen Immunantwort“ |
| Mai 2004 | Wissenschaftliche Publikation: „Necrosis-like cell death induced by bacteria in mouse macrophages“; Susanne Kirschnek, Julia Scheffel (gleichberechtigte Erstautoren), Ulrich Heinzmann und Georg Häcker, European Journal of Immunology |

Stipendien

| | |
|-----------------------|---|
| Sept. 2001-Sept. 2003 | Doktorandenstipendium der DFG im Rahmen des Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ |
| März 2003 | Reisestipendium der Carl-Duisberg-Stiftung für die Famulatur am Mount Sinai Hospital New York, USA |
| Juni 2004-Juni 2005 | Online-Stipendium bei e-fellows.net |