Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf Universität Hamburg

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

#### BEDEUTUNG VON ANNEXIN VI IN DER REZEPTOR-VERMITTELTEN ENDOCYTOSE VON LIPOPROTEINEN UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON ANNEXIN VI-MUTANTEN

## DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

# dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Tino Schnitgerhans aus Hamburg

Hamburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 18. Februar 2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. Th. Grewal

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. D. Ameis

## **INHALTSVERZEICHNIS**

1. Einleitung	1
1.1. Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Endocytose	1
1.1.1. Rezeptoren und coated pits	1
1.1.2. Regulative Proteine der Endocytose	4
1.1.3. Clathrin-coated pit unabhängige Aufnahmemechanismen	5
1.2. Intrazellulärer Transport von Liganden	8
1.2.1. Degradation	9
1.2.2. Recycling	12
1.2.3. Transcytose	13
1.2.4. Regulatoren des intrazellulären Membranverkehrs	13
1.3. Annexine	17
1.3.1. Molekulare Struktur	18
1.3.2. Intrazelluläre Lokalisation	20
1.3.3. Eigenschaften und mögliche Funktionen	21
1.3.4. Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose	
1.4. Stoffwechsel der Lipoproteine	28
1.4.1. Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine	
1.4.2. Exogener Stoffwechselweg	
1.4.3. Endogener Stoffwechselweg	
1.4.4. Reverses Cholesterintransportsystem	
1.5. Low Density Lipoprotein	31
1.5.1. LDL-Katabolismus	
1.5.2. LDL und arteriosklerotische Läsionen	
1.6. LDL-Rezeptorfamilie	33
1.6.1. Grundmotive	
1.6.2. LDL-Rezeptor	34
1.6.3. Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie	35

2. Material	37
3. Methoden	42
3.1. Zellkulturarbeiten	42
3.2. Präparation von Plasmid DNA	43
3.3. Transiente Gentransfektion	45
3.4. Präparation von Proteinextrakten	45
3.5. Proteinbestimmung	46
3.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blotting	46
3.7. Präparation humaner Lipoproteine	47

3.8. Radioaktives Markieren von LDL mit <sup>125</sup> I-Jod	47
3.9. Radioaktive Experimente	48
3.10. Immunfluoreszenz	49
3.11. Membranpräparationen	50
3.12. Sucrose-Gradient	51
4. Ergebnisse	52
4.1. Experimentelle Strategie der Analyse von Annexin VI	52
4.2. Nachweis von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in CHO-Zellen	53
4.2.1. Expression von Annexin VI	53
4.2.2. Coexpression von AnnexinVI und LDL-R	55
4.2.3. Expressionsnachweis von C-und N-terminalen Deletionsmutanten	
mit verschiedenen Annexin VI-Antikörpern	56
4.3. Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation von Annexin VI	58
4.3.1. Identifikation von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten	
transfizierten Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz	58
4.3.2. Nachweis von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in	
Membranpräparationen transfizierter Zellen	59
4.3.3. Cytosolische Lokalisation der C-terminalen Deletionsmutante $\Delta$ 1-175	62
4.3.4. Kalzium-abhängige Membranbindung von Annexin VI	63
4.3.5. Analyse der intrazellulären Verteilung von Annexin VI mit Hilfe von	
Sucrose-Gradienten	65
4.3.6. Colokalisation von Annexin VI und Annexin II	67
4.4. Rolle von Annexin VI bei der LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytose	
von Lipoproteinen	68
4.4.1. Internalisierung und Degradation von <sup>125</sup> I-LDL in Annexin VI	
überexprimierenden Zellen	68
4.4.2. Aufnahme und Abbau von <sup>125</sup> I-LDL in Annexin VI-Mutanten	
überexprimierenden Zellen	69
4.4.3. Vergleich der Aufnahme von DiI-LDL in Annexin VI und Annexin II	
überexprimierenden Zellen	77
4.4.4. Internalisation von DiI-LDL in Annexin VI und LDL-Rezeptor	
coexprimierenden Zellen	
4.4.5. Aufnahme von DiI-LDL in Annexin VI-Mutanten und	
LDL-Rezeptor coexprimierenden Zellen	79

5. Diskussion	81
5.1. Expression von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten	81
5.2. Eigenschaften und Lokalisation von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten	82
5.2.1. Intrazelluläre Verteilung von Annexin VI	

5.2.2. Einfluß C-terminaler Deletionen auf die intrazelluläre Lokalisation	. 84
5.2.3. Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation durch Verlust der	
N-terminalen Signalsequenz	. 86
5.2.4. Kalzium-abhängige Membranbindung	. 87
5.3. Rolle von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinen	89
5.3.1. Überexpression von Annexin VI stimuliert die Aufnahme von LDL	. 89
5.3.2. Überexpression von Annexin VI steigert die Degradation von LDL	. 91
5.3.3. Deletion von sechs Kern-Domänen führt zum Verlust der	
stimulatorischen Aktivität von Annexin VI	.92
5.3.4. Potentielle Rolle des N-Terminus von Annexin VI bei der Endocytose	
von Lipoproteinen	.95
5.4. Mögliche pathophysiologische Relevanz der Annexine	98
5.4.1. Eventuelle pathogene Beeinflussung des Lipoproteinstoffwechsels	98
5.4.2. Annexine und abgeleitete Krankheitsbilder	99
5.5. Ausblick 1	101
5.5.1. Identifikation Annexin VI-bindender Proteine1	101
5.5.2. Funktionelle Untersuchungen am Tiermodell	101
5.5.3. Genomanalysen	102

6. Zusammenfassung	103
7. Literaturverzeichnis	104
8. Anhang	122
9. Abkürzungen	125
10. Danksagung	126
11. Lebenslauf	127
12. Erklärung	128

## ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELE DER ARBEIT

Diese Arbeit soll weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften und die noch immer nicht vollständig verstandene Rolle des Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen liefern.

# 1. Konstruktion und Expression von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in CHO-Zellen

Die Überexpression ist ein etabliertes Verfahren zur Identifikation der Funktion von Proteinen. Zur Studie von Annexin VI wird ein geeigneter Expressionsvektor konstruiert. Die Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen muß gewährleistet und biochemisch nachgewiesen werden. In der funktionellen Analyse des Proteins beobachtete Phänomene sollen die Grundlage der strategischen Konstruktion von Deletions- und Punktmutanten bilden. Mit Hilfe der Mutanten soll die Funktion von Annexin VI kartiert und molekular-strukturell zugeordnet werden. Die Expression der Mutanten in CHO-Zellen muß etabliert und bestätigt werden.

# 2. Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten

Die kontrovers diskutierte und in unterschiedlichen Zelltypen variierende Lokalisation von Annexin VI soll in CHO-Zellen analysiert werden. Vorläufige Experimente deuten auf eine Rolle von Annexin VI bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose hin. Diese Funktion soll auf eine Korrelation mit der Lokalisation des Proteins untersucht werden. Die Analyse der intrazellulären Verteilung von Annexin VI-Mutanten soll außerdem überprüfen, ob die Lokalisation von Annexin VI durch bestimmte Domänen definiert wird.

# 3. Funktionelle Analyse von Annexin VI für die LDL-Rezeptor-vermittelte Endocytose von Lipoproteinen

Der Einfluß der Annexin VI-Überexpression in CHO-Zellen auf die zelluläre Aufnahme und Verstoffwechselung von LDL soll biochemisch erforscht werden. Hierbei sollten bereits bekannte Ergebnisse bestätigt werden. Einen Zuwachs an Information soll die Analyse der Überexpression verschiedener Annexin VI-Mutanten in CHO-Zellen ermöglichen. Deren Auswirkungen auf die Rezeptor-vermittelte Endocytose von Lipoproteinen sind mit den Untersuchungen des Annexin VI Wildtyps zu vergleichen. Somit sollen funktionell bedeutende Strukturen und Regionen des Annexin VI-Proteins identifiziert werden.

### **1. EINLEITUNG**

#### 1.1. Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Endocytose

Die Aufnahme extrazellulärer Moleküle in eine Zelle ist ein Prozeß von umfassender biologischer Bedeutung. Eukaryotische Zellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um Makromoleküle in ihr Inneres zu transferieren, die nicht durch die Plasmamembran diffundieren oder Transportkanäle passieren. Diese Prozesse werden zusammenfassend als Endocytose beschrieben (Mukherjee et al., 1997). Endocytotische Mechanismen sind das Fundament zahlreicher physiologischer Prozesse. Hierzu zählen die Aufnahme essentieller Metaboliten, Antigenpräsentation, Erhaltung von Zellpolarität oder Vermittlung der Zellantwort auf viele Proteohormone und Wachstumsfaktoren. Viele Viren, Toxine und Mikroorganismen gelangen über Endocytose in Zellen. So zentral die Bedeutung der Endocytose in der Heranreifung und Erhaltung des menschlichen Organismus, so gravierend können sich Störungen manifestieren und oftmals Krankheiten wie Arteriosklerose und Diabetes mellitus zugrunde liegen. Den wichtigsten und wohl am besten charakterisierten Aufnahmemechanismus stellt die Rezeptorvermittelte Endocytose via Stachelsaum-Vesikel (Clathrin-coated Vesikel) dar.

#### 1.1.1. Rezeptoren und coated pits

Zahlreiche Liganden werden über die Rezeptor-vermittelte Endocytose via Clathrincoated pits internalisiert. Die spontane oder durch Ligandenbindung provozierte Anhäufung von Rezeptoren in coated pits bildet den initialen Schritt dieses Aufnahmeweges. Einige Membranrezeptoren, wie der LDL- (Anderson et al., 1982) und der Transferrin-Rezeptor (Hopkins u. Trowbridge, 1983), liegen unabhängig von einer Ligandenbindung angereichert in den coated pits vor. Andere, wie der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R), sind zunächst gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt (Haigler et al., 1979). Sie sammeln sich erst nach Interaktion mit Liganden in den speziellen Regionen an. Nur wenige Rezeptoren, wie das Hämagglutinin-Protein der Influenzaviren, sind selektiv nicht in coated pits anzutreffen (Roth et al., 1986).

#### 1.1.1.1. Clathrin-coated pits

Coated pits sind zum ersten Mal in Moskito-Oocyten als invaginierte Plasmamembran-Strukturen beschrieben worden (Roth u. Porter, 1964). Es handelt sich um spezialisierte Membranbereiche, welche in humanen Fibroblasten 2 % der Zelloberfläche bilden (Anderson et al., 1977). Die cytosolische Seite dieser Einbuchtung besitzt eine Hülle aus Clathrin, welches aus dem Cytoplasma rekrutiert wird (Kirchhausen, 1993). Dieses Protein ist ein Trimer aus drei leichten (35 kD) und drei schweren Ketten (180 kD). Eine Clathrineinheit bildet eine dreibeinige Struktur, das Triskelion. An der Plasmamembran bilden die Triskelien ein Gitterwerk aus hexagonalen Polyedern (Schmid, 1992). Abb. 1.1. liefert eine schematische Darstellung eines Triskelions im Clathringitter.



Abb. 1.1.: Schematische Darstellung eines Clathrin Triskelions im polyedrischen Gitterwerk

Die 50 nm langen schweren Ketten (blau) legen sich an ihren Carboxy-Termini zu einer dreibeinigen Struktur zusammen. Jede schwere Kette wird durch eine Biegung in eine proximale und eine distale Einheit unterteilt. Die leichten Ketten (orange) assoziieren mit den proximalen Armen der entsprechenden schweren Ketten (Keen, 1990). Aufgrund hoher Flexibilität kann das Triskelion sowohl Bestandteil eines Pentagons wie auch eines Hexagons sein. Die N-Termini der schweren Clathrin-Ketten interagieren mit der 100 kd β-Einheit der membrangebundenen Adapterproteine (grün).

Mehrere strukturell verwandte Klassen von Adapter-Proteinen binden an das Clathrin: Mit den coated pits der Plasmamembran assoziiert das sogenannte AP2 (Ahle et al., 1988; Robinson et al., 1992). AP2 besteht aus zwei Untereinheiten mit ungefähr 100 kD ( $\beta_2$  und  $\alpha_{A/C}$ ) und zwei kleineren Untereinheiten mit 50 kD bzw. 17 kD ( $\mu_2$  und  $\sigma_2$ ). Die  $\beta$ -Untereinheit der bereits Membran-gebundenen Adapter-Proteine assoziiert mit dem N-Terminus der schweren Clathrin-Ketten (Ahle u. Ungewickell, 1989). Hierbei positioniert sich AP2 zwischen die Plasmamembran und das Clathringitter. AP1 hingegen findet sich an Membranen des trans-Golgi-Netzwerks (Ahle et al., 1988; Robinson et al., 1992). Es besteht ebenfalls aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (Pearse u. Robinson, 1984; Matsui u. Kirchhausen, 1990). Der erst später entdeckte AP3-Komplex (Dell'Angelica et al., 1997) ist am Transportweg zwischen trans-GolgiNetzwerk und Lysosomen beteiligt (Gagescu et al., 2000). Die spezifische Verteilung der Adapter-Proteine in der Zelle wird vermutlich über AP-Rezeptoren vermittelt, welche jedoch noch nicht eindeutig identifiziert sind (Robinson et al., 1996).

#### 1.1.1.2. Internalisationssignale

Adapter-Proteine vermitteln durch Interaktion mit Sequenzen cytoplasmatischer Rezeptordomänen die selektive Konzentration der Rezeptoren in Clathrin-coated pits. Die Signalsequenzen besitzen in der Regel ein Tyrosin innerhalb einer konservierten Tetrapeptidsequenz. Diese Erkenntnisse gehen unter anderem auf die Untersuchung eines Endocytose-defekten humanen LDL-Rezeptors zurück ("Patient J.D." nach Goldstein u. Brown, 1976). Hier ersetzt eine Punktmutation ein Tyrosin des Rezeptorschwanzes durch Cystein (Davis et al., 1987). Sequenzanalysen haben gezeigt, daß die Aminosäurenfolge NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) zur Internalisation des LDL-Rezeptors erforderlich ist (Davis et al., 1987). Innerhalb des NPXY ist Tyrosin umgeben von polaren Aminosäureresten. Sie bilden eine Schleife und können somit als strukturelles Signal dienen (Ktistakis et al., 1990). Ähnliche Internalisierungssequenzen sind in cytosolischen Domänen weiterer Rezeptoren identifiziert worden: YXRF (Tyr-X-Arg-Phe) beim Transferrin-Rezeptor (Jing et al., 1990; McGraw u. Maxfield, 1990), YSKV (Tyr-Ser-Lys-Val) des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (Lobel et al., 1989). Die Position dieser Motive ist variabel und vermittelt auch die Internalisation von Rezeptoren, die diese Sequenz primär entbehren. Der Einbau einer Internalisierungssequenz in die cytosolische Domäne des Hämagglutinin führt zur Aggregation in coated pits (Lazarovits u. Roth, 1988).

In den vergangenen Jahren sind weitere Internalisationssignale identifiziert worden: Einige transmembranöse Proteine wie das CD4 Antigen besitzen ein sogenanntes di-Leucin-Internalisierungsmotiv (Pelchen-Matthews et al., 1991). Dieses ist ebenfalls in der Lage, mit AP2 zu interagieren und vermittelt vermutlich analog zum NPXY die Internalisierung von Rezeptoren und Liganden (Marks et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit der Zielsteuerung von Oberflächenproteinen ist die Bindung an den C-Terminus von Ubiquitin (Ciechanover, 1994).

#### 1.1.2. Regulative Proteine der Endocytose

Die Bildung des Clathrin-Gitters und das weitere Schicksal der coated pits unterliegt dem Einfluß zahlreicher Proteininteraktionen.

#### 1.1.2.1. Adapter-Proteine

Die Bindung von Adapter-Proteinen an die Internalisationssequenzen wird in verschiedenen Studien biochemisch belegt (Pearse, 1988; Sorkin u. Carpenter, 1993). Dabei interagiert die  $\mu$  Untereinheit der AP mit dem NPXY-Motiv (Ohno et al., 1995). Die Interaktion mit dem Clathrin-Gitter erhöht die Affinität des AP2-Komplexes zu den Internalisierungssequenzen. 1996 ist von Goodman ein weiterer Adapter-Mechanismus beschrieben worden: Die Bindung von Agonisten an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren führt zu deren Phosphorylierung und zur Anlagerung von  $\beta$ -Arrestin an die cytosolischen Domänen.  $\beta$ -Arrestin interagiert mit Clathrin und fördert somit die Konzentration und Internalisation der Rezeptoren (Goodman et al., 1996). 1999 jedoch hat Laporte die Rekrutierung von AP2 durch  $\beta$ -Arrestin/ $\beta_2$ -Rezeptor-Komplexe nachweisen können (Laporte et al., 1999).

## 1.1.2.2. Dynamin und Cytoskelett

Die Einstülpung der coated pits zur Bildung umhüllter Vesikel wird durch eine Neuordnung des Clathrin-Gitters ermöglicht. Aus dieser geht ein Netzwerk pentagonaler Polyeder hervor. Die Invagination erfordert Energie in Form von ATP (Schmid u. Carter, 1990). Die Abschnürung umhüllter Vesikel wird durch Dynamin (100 kD) vermittelt: Dieses legt sich in ringförmigen, helikalen Strukturen um den Hals der eingestülpten Membran (Takei et al., 1995; Hinshaw u. Schmid, 1995). Eine GTP-abhängige Konformationsänderung des Dynamin führt dann zur Ablösung eines Clathrin-umhüllten Vesikels von der Membran. Die Anlagerung des Dynamin an das Clathrin-Gitter wird durch Amphiphysin I und II vermittelt. Diese beiden Proteine binden Clathrin und AP2 (Wigge u. McMahon, 1998).

Neben der Aktivität von Dynamin ist für die physikalische Ablösung der 100-150 nm großen Vesikel ein cytoskelettaler Umbau erforderlich. Spectrin, Aktin, Protein 4.1 und Ankyrin bilden an der cytosolischen Membranoberfläche ein Netz oligomerischer

Komplexe (Bennett u. Gilligan, 1993; Beck u. Nelson, 1996). Das Spectrin ist hierbei über Ankyrin mit verschiedenen Membranproteinen, über Protein 4.1 mit Aktinfilamenten verbunden (Byers u. Branton, 1985; Conboy, 1993). Spectrin ist ein Tetramer aus zwei α- (je 260 kD) und zwei β-Ketten (je 225 kD) (Bennett, 1990; Goodman et al., 1995). Die Ablösung eines Clathrin-umhüllten Vesikels von der Plasmamembran geht mit der Neuordnung des Spectrin-Aktin-Maschenwerks einher (Kamal et al., 1998). Der Umbau wird durch die Cystein-abhängige Protease Calpain I vermittelt. Sie spaltet die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten des Spectrins, wodurch Tetramerbildung und Aktinbindung verhindert werden (Harris u. Morrow, 1990). Bei Inhibition der Calpain-Protease entwickeln die Zellen nach einer Stunde einen alternativen, Spectrin-unabhängigen Aufnahmemechanismus (Kamal et al., 1998). Die Generation Spectrin-unabhängiger Vesikel weist jedoch eine veränderte intrazelluläre Lokalisation und ein gestörtes Stoffwechselverhalten auf. Dieses verdeutlicht die entscheidende Rolle des Cytoskeletts bei der Regulation des Membranverkehrs. Aktuelle Untersuchungen unterstreichen die Komplexität der cytoskelettalen Modulierung: Eine Domäne von Ankyrin bindet mit hoher Affinität an den N-Terminus der schweren Clathrin-Kette und spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der coated pit-Knospung (Michaely et al., 1999).

#### 1.1.3. Clathrin-coated pit unabhängige Aufnahmemechanismen

Neben der detailliert charakterisierten Rezeptor-vermittelten Endocytose via Clathrincoated pits spielen andere Aufnahmemechanismen ebenfalls eine große physiologische Rolle (Lamaze u. Schmid, 1995).

#### 1.1.3.1. Fluid-Phase-Endocytose

Die unselektionierte Aufnahme gelösten Materials (Fluid-Phase-Endocytose) erfolgt über die Invagination nicht rezeptortragender Membranbereiche und die Bildung Clathrin-freier Vesikel (Lamaze u. Schmid, 1995). Die formierten glatten Vesikel sind mit einem Durchmesser von 100 nm etwas kleiner als die Clathrin-umhüllten. Dieser Internalisationsmechanismus kann anhand der Aufnahme von Meerrettich-Peroxidase (HRP) studiert werden (Mukherjee et al., 1997). Auf den Ausfall der Clathrin-abhängigen Endocytose antwortet die Zelle mit der Hochregulation der unspezifischen Aufnahme (Robinson et al., 1995).

#### 1.1.3.2. Caveolae

Caveolae sind 50-80 nm große, kolbenartige Membraneinstülpungen. Entscheidend ist die Präsenz des Markerproteins Caveolin (Anderson, 1998). Dieses ist Bestandteil integraler Membranproteine auf der cytoplasmatischen Seite der Caveolae (Rothberg et al., 1992). Das Expressionsniveau von Caveolin 1 korreliert mit der Anzahl invaginierter Caveolae (Smart et al., 1996) und ist für die Stabilisierung dieser Mikrodomänen verantwortlich. Caveolae beeinhalten einen Lipidkern aus Glycosphingolipiden, Sphingomyelin und Cholesterol (Kurzchalia u. Parton, 1999). Der Cholesterolanteil in Caveolae wird über ein Lipid-Transportsystem zwischen Plasmamembran und Endoplasmatischem Retikulum (ER) konstantgehalten. Hierbei fungiert das Cholesterol-bindende Caveolin 1 als Trägermolekül (Murata et al., 1995). In den Caveolae vollzieht sich ein dynamischer Cholesterolaustausch mit dem Extrazellularraum (Fielding u. Fielding, 1997). Hier findet sich auch der Scavenger Rezeptor BI, das High Density Lipoprotein (HDL) bindende Protein der Scavenger Rezeptor-Familie (Acton et al., 1996; Babitt et al., 1997). Der Lipidkern der Caveolae assoziiert außerdem mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen (Brown u. Rose, 1992; Varma u. Mayor, 1998; Friedrichson u. Kurzchalia, 1998). Obwohl Caveolin 1 mit GPI-bindenden Proteinen interagiert, ist die Notwendigkeit dieses Prozesses für die Ansammlung der Moleküle in Caveolae noch nicht gesichert (Anderson, 1998). Die Konzentration kleiner Moleküle in Caveolae und ihre Überführung in das Cytoplasma, wird mit dem Begriff "Potocytose" umschrieben. Sie ist vor allem am GPI-verankerten Folat-Rezeptor untersucht worden (Anderson et al., 1992). Der Prozeß der Invagination der Caveolae ist trotz beschriebener Cholesterol- und Caveolin 1-Abhängigkeit noch immer ungeklärt. Die Ablösung von der Plasmamembran erfolgt in der Anwesenheit von Dynamin (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998). Postuliert wird jedoch ein von der Clathrin-abhängigen Endocytose differierender Einstülpungsmechanismus (Schnitzer et al., 1994; Deckert et al., 1996; Anderson et al., 1996).

#### 1.1.3.3. Makropinocytose

Weitaus größere endocytotische Strukturen bilden die Makropinosomen. Sie besitzen einen Durchmesser von 0,5 bis 5 µm und können große Volumina unselektiv in das Zellinnere aufnehmen. Makropinocytose wird in Zellen der Immunabwehr (vornehm-

lich Makrophagen) und in Tumorzellen beobachtet. Makropinosomen entstehen nach Aktinpolymerisation aus tassenförmigen Ausstülpungen des Cytoplasmas. Diese können fusionieren und als intrazelluläre Vesikel die Plasmamembran verlassen. Die Anreicherung von Hüllproteinen und Rezeptoren wird nicht beobachtet (Racoosin u. Swanson, 1992). Die immunologische Bedeutung der Makropinocytose liegt in der Präsentation endocytierter Antigene auf MHC II- (Sallusto et al., 1995) und vermutlich auch auf MHC I-Proteinen (Norbury et al., 1995).

#### 1.1.3.4. Phagocytose

Vor der Entdeckung der aufgeführten pinocytotischen Prozesse ist erstmals im Jahre 1893 das Phänomen des "Zellfressens" beschrieben worden (Metchnikoff, 1893). Dieses findet vornehmlich in spezialisierten Zellen wie neutrophilen Granulocyten und Mitgliedern des mononukleären Phagocytensystemes statt (Falkow et al., 1992). Neben der Beseitigung von Membranbruchstücken und überalterten Blutzellen liegt ein Schwerpunkt dieses Mechanismus in der Körperabwehr.

Die Phagocytose ist Rezeptor-abhängig (Rabinovitch, 1995): Moleküle und Mikroorganismen werden entweder von den Oberflächenproteinen direkt erkannt oder müssen zuvor opsoniert werden. Hierbei werden die Partikel von Komponenten des Komplementsystems oder Immunglobulinen umhüllt (Greenberg u. Silverstein, 1993). Die spezifischen Oberflächenrezeptoren binden an das native Protein bzw. den Opsonin-Mantel. Dieses induziert einen cytoskelettalen Umbau (Greenberg, 1995) und die lokalisierte Umfließung des Partikels mit langen zellulären Fortsätzen, den Pseudopodien. Die Plasmamembran hangelt sich dabei sequentiell von einer Bindungsstelle zur anderen (Griffin et al., 1975 und 1976). Die Fusion der Pseudopodien führt zum Einschluß einer Membranvakuole – dem Phagosom (Swanson u. Baer, 1995). Dieses durchläuft anschließend einen der Rezeptor-vermittelten Endocytose verwandten Weg voller Interaktionen mit endosomalen Organellen (Pitt et al., 1992; Desjardins, 1995).

Abb. 1.2. gibt eine schematischen Überblick über die verschiedenen Aufnahmemechanismen. Einleitung



Abstrahierte und vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen und Wege der endocytotischen Internalisation: A Clathrin-abhängige Endocytose, **B** Fluid-phase-Endocytose, **C** Endocytose via Caveolae, **D** Makropinocytose und **E** Phagocytose.

#### 1.2. Intrazellulärer Transport von Liganden

Die erhöhte Konzentration von Rezeptoren in Clathrin-coated pits erlaubt eine effiziente Aufnahme von Liganden (Anderson et al., 1977 und 1982). Nach der Ablösung eines coated Vesikels wird die Hülle mit Hilfe einer uncoating ATPase (70 kD) entfernt (Rothman u. Schmid, 1986). Von diesem Zeitpunkt an wird das "nackte" Vesikel als Endosom bezeichnet. Endosomen sind Strukturen unterschiedlicher Größe und Form, die in frühe und späte endosomale Kompartimente unterteilt werden (Mukherjee et al., 1997). Sie lassen sich neben dem Nachweis verschiedener assoziierter Proteine in Funktion, Morphologie und pH-Wert unterscheiden. Die frühen endosomalen Kompartimente setzen sich zusammen aus den sortierenden und den rezyklierenden Endosomen. Die späten Kompartimente umfassen die endosomalen Trägervesikel (ECVs), die späten Endosomen und die Lysosomen. Der Identifikation endosomaler Kompartimente dient auch die Anwesenheit bestimmter Liganden. Die Transportwege und die Verstoffwechselung von Rezeptor-vermittelt internalisierten Liganden lassen sich in drei Grundprinzipien unterteilen:

- Degradation: Das frühe Endosom fusioniert mit dem sortierenden Endosom. Die dabei erfolgte pH-Änderung führt zur Dissoziation des Liganden von seinem Rezeptor. Während der Rezeptor über ein rezyklierendes Endosom an die Zelloberfläche zurückgebracht wird, unterliegt der Ligand im Lysosom seiner Verdauung.
- *Recycling:* Einige Liganden bleiben in den sortierenden Endosomen mit ihren Rezeptoren assoziiert und werden mittels rezyklierender Endosomen wieder an die Membranoberfläche transferiert.
- *Transcytose:* Bestimmte Proteine nutzen die Rezeptor-vermittelte Endocytose zur Übertragung von der Oberfläche zur gegenüberliegenden Seite einer polarisierten Zelle.

Um diese komplexen Aufnahmemechanismen und die involvierten Zellstrukturen zu beschreiben, werden im folgenden verschiedene Liganden und Rezeptoren auf ihren divergierenden Wegen durch die Zelle begleitet.

#### 1.2.1. Degradation

Eines der am besten charakterisierten endocytotischen Systeme ist die Aufnahme von Low Density Lipoprotein (LDL). Ihre Studie hat maßgeblich zum Verständnis der Rezeptor-vermittelten Endocytose beigetragen. LDL besteht zu ungefähr 75 % aus Lipiden (vor allem Cholesterinester) und zu 25 % aus Protein (siehe Kapitel 1.4.1. und 1.5.1.). Die Interaktion von LDL mit der Ligandenbindungsdomäne der LDL-Rezeptoren wird durch ApoB<sub>100</sub> vermittelt, ein großes 549 kD Protein. Die Anreicherung der LDL-Rezeptoren in coated pits und ihre kurze Verweildauer an der Zelloberfläche (Anderson et al., 1977) ermöglichen eine effiziente Aufnahme der Lipoproteine.

#### 1.2.1.1. Sortierende Endosomen

Das frühe Endosom fusioniert rasch mit dem sortierenden Endosom (CURL), wobei die intermediären Prozesse dieses Schrittes noch nicht vollständig geklärt sind. Die zahlreichen Fusionen führen in den sortierenden Endosomen zu einem stetigen Anstieg der LDL-Menge, welche nach 10 Minuten ein 30 fach erhöhtes Niveau erreicht (Ghosh et al., 1994). Das sortierende Endosom ist ein 250-400 nm großes Vesikel mit tubulären Ausstülpungen. Voraussetzung seiner sortierenden Eigenschaft ist die Ansäuerung des Kompartimentes durch ATP-abhängige Protonenpumpen (Tycko u. Maxfield, 1982; Rome, 1985; Linderman u. Lauffenburger, 1988; Dunn et al., 1989). Die peripher im Cytoplasma verteilten CURLs besitzen einen internen pH-Wert von 5.9-6.0. Der erniedrigte pH-Wert induziert eine Konformationsänderung des LDL-Rezeptors, welche zur Dissoziation des LDL vom Rezeptor führt. Die Rezeptoren sammeln sich in den tubulären Ausstülpungen (Maxfield u. Yamashiro, 1991). Diese lösen sich anschließend von den sortierenden Endosomen ab und bilden sogenannte rezyklierende Endosomen (RRCs) (siehe Abb. 1.2.). Mit ihrer Hilfe wird der LDL-Rezeptor zur Zelloberfläche transferiert, von wo aus er den Zyklus noch mehrmals durchläuft. Unabhängig von der Ligandenbindung benötigt der LDL-Rezeptor 10 Minuten für eine intrazelluläre Passage, wobei er insgesamt ungefähr 150 mal rezykliert (Goldstein et al., 1985).

#### 1.2.1.2. Späte Endosomen

Auf dem Weg des LDL zu den Lysosomen entwickeln sich die sortierenden Endosomen in einigen Zwischenschritten nach dem sogenannten Reifungsmodell zu den späten Endosomen (Dunn u. Maxfield, 1992). Diese Reifung beginnt mit der Ablösung von Vesikeln aus den sortierenden Endosomen (Gruenberg u. Maxfield, 1995), die aufgrund ihrer Funktion als endosomale Trägervesikel (ECVs) bezeichnet werden (Gruenberg et al., 1989). Einige Autoren nennen sie wegen ihrer zwiebelschalenartigen Membraninvaginationen (van Deurs et al., 1993) auch multivesikuläre Körperchen (MVBs) (Hopkins, 1983; Dunn et al., 1986). In der Literatur werden teilweise auch späte Endosomen mit dem Begriff "MVBs" umschrieben, weswegen im weiteren Text auf diese Nomenklatur verzichtet wird. Die ECVs bewegen sich entlang von Microtubuli in Richtung Zellzentrum (Gruenberg et al., 1989). Ihre microtubuläre Assoziation wird durch das CLIP 170-Protein vermittelt (Pierre et al., 1992). Auf diesem Weg erfolgt die Reifung der LDLreichen ECVs zu späten Endosomen. Voraussetzung ist die Veränderung der Membranprotein-Komposition und die weitere Ansäuerung des internen Milieus (Aniento et al., 1996). Die Aufrechterhaltung eines pH-Wertes von 5.5-6.0 wird den späten Endosomen durch das Fehlen der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ermöglicht: Diese würde durch Etablierung eines positiven inneren Membranpotentials die Protonenpumpen in ihrer Aktivität drosseln (van Weert et al., 1995).

#### 1.2.1.3. Lysosomen

Durch Fusion von späten Endosomen mit vorhandenen Lysosomen wird die finale Degradation der LDL eingeleitet. Die größtenteils perinukleär lokalisierten Lysosomen haben einen pH-Wert von 5.0-5.5. Die Azidität gewährleistet eine optimale Aktivität der lysosomalen Enzyme. Diese werden zuvor durch den Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat Rezeptor aus dem trans-Golgi-Netzwerk transportiert (Kornfeld, 1992). Die Proteinkomponente des LDL wird zu freien Aminosäuren degradiert, die Cholesterinester durch lysosomale saure Lipase hydrolysiert. Die hohe intraluminale Konzentration und vermutlich spezifische Transportmechanismen ermöglichen den Efflux der Abbauprodukte und des freien Cholesterols in das Cytoplasma (Tabas, 1995; Lange u. Steck, 1996).

Der Stoffaustausch zwischen späten Endosomen und Lysosomen erfolgt jedoch keineswegs unidirektional: Transiente Fusionsprozesse ermöglichen einen dynamischen Materialverkehr zwischen den beiden Kompartimenten (Jahraus et al., 1994). Neben dem terminalen Abbau internalisierten Materials sind Lysosomen auch für die Speicherung unverdaulicher Stoffe verantwortlich.

#### 1.2.1.4. Epidermaler Wachstumsfaktor

An dieser Stelle soll kurz auf den Stoffwechsel des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) eingegangen werden. Hier werden sowohl Ligand, als auch Rezeptor in Lysosomen abgebaut. Der EGF-Rezeptor (170 kD) reichert sich erst nach Bindung von Wachstumsfaktor in den coated pits an (Dunn u. Hubbard, 1984). Nach Aufnahme erfolgt in den sortierenden Endosomen die Dissoziation des EGF von seinem Rezeptor. Diese resultiert aus einer pH-abhängigen Konformationsänderung des EGF-Rezeptors (DiPaola et al., 1984). Der epidermale Wachstumsfaktor passiert die späten Endosomen und wird in den Lysosomen verdaut. Der EGF-Rezeptor rezykliert jedoch nicht, sondern ist ebenfalls zur Degradation in den Lysosomen bestimmt. Spezifische Rezeptorsequenzen und die Bindung an das sortierende Protein Nexin I, werden für dieses Verhalten verantwortlich gemacht (Honegger et al., 1987; Kurten et al., 1996).

### 1.2.2. Recycling

Das Rezyklieren von Ligand und Rezeptor an die Zelloberfläche läßt sich anhand des Transferrin-Zyklus veranschaulichen. Das 77 kD Serumprotein Transferrin ist verantwortlich für den Transport von Eisen zwischen Speichern, Absorptionsorten und Verwertungsstellen. Ein mit Eisen komplexiertes Transferrin bindet an den Transferrin-Rezeptor im coated pit – ein dimerisches Glykoprotein aus zwei identischen, über Disulfidbrücken verbundenen 90 kD-Untereinheiten (Schneider et al., 1982; Omary u. Trowbridge, 1981). Bei der Entstehung des sortierenden Endosoms führt die Ansäuerung des Milieus zur Dissoziation des Fe<sup>3+</sup> vom Transferrin (Klausner et al., 1983). Das Eisen wird später im Ferritin des Cytosols gespeichert. Das Transferrin bleibt jedoch an seinem Rezeptor gebunden (Dautry-Varsat et al., 1983; Rao et al., 1983) und findet sich in der tubulären Ausstülpung des sortierenden Endosoms.

#### 1.2.2.1. Rezyklierende Endosomen

Den effizienten Transport des Rezeptor-gebundenen Transferrins zur Zelloberfläche gewährleisten die rezyklierenden Endosomen. Dieses Rezeptor-rezyklierende Kompartiment (RRC) bildet ein prominentes Netzwerk aus den zuvor von den sortierenden Endosomen abgelösten Strukturen (Tooze u. Hollinshead, 1991; Hopkins et al., 1994). Rezyklierende Endosomen sind von den sortierenden optisch differenzierbar (Dunn et al., 1989; Marsh et al., 1986; Mayor et al., 1993). Sie sind in unterschiedlichen Zelltypen sowohl perinukleär, als auch cytoplasmatisch verteilt lokalisierbar. Ihr interner pH-Wert von 6.4-6.5 (Presley et al., 1993) ist für ein optimales Transferrin-Recycling essentiell (Johnson et al., 1993). Dieses erfolgt jedoch nicht nur pH-, sondern auch Phosphorylierungsabhängig (McGraw et al., 1988). An der Zelloberfläche verschmilzt das rezyklierende Endosom mit der Plasmamembran: Transferrin weist bei pH 7.4 nur eine geringe Affinität zum Rezeptor auf und dissoziiert. Die Transferrin-Rezeptoren verlassen das rezyklierende Kompartiment mit einer Halbwertszeit von ungefähr 10 Minuten (McGraw u. Maxfield, 1990). Dieser vergleichsweise behäbige Schritt macht das RRC zur Hauptlokalisation intrazellulären Transferrins und seines Rezeptors. Eine intrazelluläre Transferrin-Passage dauert etwa 16 Minuten. Jeder Transferrin-Rezeptor rezykliert während seiner Lebensdauer ungefähr 300 mal (Omary u. Trowbridge, 1981).

Neben dem Materialtransfer in Richtung Plasmamembran führt das RRC auch retrograd Membrankomponenten den sortierenden Endosomen zu. Somit wird eine frühendosomale Kompositionsstabilität gewährleistet (Ghosh u. Maxfield, 1995).

#### 1.2.3. Transcytose

Einige Liganden müssen intakt durch Zellen transportiert werden, um ihre Funktion auszuüben. Diese transzelluläre Passage wird als Transcytose bezeichnet und spielt im Stoffwechsel des Immunglobulin A eine wichtige Rolle. IgA wird von Plasmazellen entweder als 160 kD-Monomer oder als Polymer, kovalent verbunden mit einem 15 kD-Junktionsprotein, sezerniert. Das biologisch aktive IgA-Polymer findet sich in Körpersekreten, einschließlich Galle, Speichel und Tränenflüssigkeit (Mestecky u. McGhee, 1987). IgA bindet an der basolateralen Membran von Hepatocyten seinen in coated pits angereicherten Rezeptor (Mestecky u. McGhee, 1987). Der internalisierte IgA-Rezeptor unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Transmembranproteinen: Im gebundenen Zustand passiert er mit seinem Liganden in Form einer sekretorischen Komponente die Zelle (Song et al., 1994 und 1995). Hierbei wird der Rezeptor intrazellulär gespalten und als sogenanntes S-Fragment gebunden an IgA apikal sezerniert (Mostov, 1994). Das polymerische IgA wird so der Gallenflüssigkeit zugeführt. Lediglich unbesetzte IgA-Rezeptoren werden nach Internalisation an die basolaterale Membran lokal rezykliert (Hunziker et al., 1994; Mostov, 1994; Tamer et al., 1995).

#### 1.2.4. Regulatoren des intrazellulären Membranverkehrs

Diverse cytosolische, integrale oder Membran-assoziierte Proteine kontrollieren endocytotische Prozesse und definieren mitunter die Eigenschaften zellulärer Organellen.

1.2.4.1. NSF, SNAPs und SNAREs

Die Generation und Fusion von Transportvesikeln im endosomalen Verkehr unterliegt der direkten Kontrolle durch cytosolische Proteinkomplexe. Diese setzen sich zusammen aus dem NSF (NEM sensitiver Faktor) (Block et al., 1988) und damit assoziierten Proteinen, sogenannten SNAPs (Wilson et al., 1992). Die Spezifität des Vesikelfusionsprozesses wird durch SNAP-Rezeptoren (SNAREs) gewährleistet (Wilson et al., 1992). Auf der Vesikelmembran befindliche v-SNAREs und t-SNAREs der Zielmembran interagieren über ihre cytoplasmatischen Domänen mit dem NSF/SNAP-Komplex (Söllner et al., 1993). Dieses ist der entscheidende Schritt zur Einleitung von Andoc??kung und Vesikelfusion. Cellubrevin, ein Homolog des v-SNARE im endocytotischen Rezyklierungsweg (McMahon et al., 1993), reguliert den Transport zwischen rezyklierendem Kompartiment und Plasmamembran (Robinson et al., 1996). Eine Abhängigkeit frühendosomaler Fusionsprozesse und des Transferrin-Recyclings von ähnlichen Proteinen ist nicht auszuschließen (Diaz et al., 1989; Martys et al., 1995; Rodriguez et al., 1995).

#### 1.2.4.2. Rab Proteine

Fast sämtliche Schritte des intrazellulären Membrantransports unterliegen der Beteiligung von Rab Proteinen (Zerial u. Stenmark, 1993; Novick u. Zerial, 1997). Rab Proteine assoziieren mit Transportvesikeln und vermitteln in einem GTP-abhängigen Prozeß Membranfusionen. Die kleinen GTPasen (20-30 kD) interagieren mit Vesikelmembranen in ihrer aktivierten GTP-gebundenen Form. Nach GTP-Hydrolyse bindet der freie Rab-GDP Komplex im Cytosol an den GDP-Dissoziations-Inhibitor GDI (Sasaki et al., 1990; Soldati et al., 1994; Ulrich et al., 1994). Erst nach Entfernung des GDI durch einen cytosolischen Faktor (GDF) (Dirac-Svejstrup et al., 1997) binden die Rab Proteine an die Donormembran. Zur Verankerung an Membranen wird die Carboxyterminale Region der Rab Proteine prenyliert (Casey u. Seabra, 1996; Shen u. Seabra, 1996; Schalk et al., 1996). Ein GTP/GDP-Austausch, welcher durch den Guanin-Nukleotid Austauschfaktor (GEF) katalysiert wird, führt zu ihrer Reaktivierung (Ullrich et al., 1994; Soldati et al., 1994). Nach Einleitung eines weiteren Zyklus und Bindung an der Akzeptormembran beendet die GTP-Hydrolyse durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Aktivierungsphase (Fukui et al., 1997). Abb. 1.3. veranschaulicht den Rab Protein-Zyklus schematisch.

Die Rab Proteine lokalisieren hochspezifisch an verschiedenen subzellulären Fragmenten. Dieses erleichtert die Identifikation zellulärer Kompartimente: Rab5 beispielsweise assoziiert mit frühen Endosomen. Es ist an dem Membrantransport von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen, sowie der frühen endosomalen Fusion beteiligt (Gorvel et al., 1991; Bucci et al., 1992; Stenmark et al., 1994): Die Expression einer nur GTP-bindenden Rab5 Mutante führt zur Ausbildung ungewöhnlich großer früher Endosomen. Die Internalisierung von Transferrin ist in diesen Zellen erhöht, das Recycling

14

erniedrigt (Stenmark et al., 1994). Zum Verständnis der zellulären Rolle des Rab5 erfolgt die Suche nach Effektormolekülen: Rabaptin-5 ist eine Interaktion mit aktiviertem Rab5 nachgewiesen worden (Stenmark et al., 1995). Die Entfernung von Rabaptin-5 aus dem Cytosol führt zur Inhibition endosomaler Fusion. Nach Bindung eines Rabaptin-5-Rabex5-Komplexes rekrutiert Rab5 das sogenannte EEA1 an frühen Endosomen (Simonsen et al., 1998). EEA1 (frühes endosomales Antigen) ist ein Phosphatidylinositol-3-Phosphat bindendes Protein (Patki et al., 1997) und essentiell für die Fusion früher Endosomen (Simonsen et al., 1998).





Das Rab Protein ist als rosafarbener Kreis dargestellt. **1** GDP-gebundenes inaktives Rab Protein wird im Cytosol durch den GDP-Dissoziations-Inhibitor (GDI) stabilisiert. **2** Zur Bindung des Rab-GDP an die Membran eines Donor-Vesikels wird der GDI durch den GDI-Displazierungs-Faktor (GDF) entfernt. **3** Der Austausch von GDP durch GTP wird durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) katalysiert. **4** An der Vesikelmembran findet sich GTP-gebundenes Rab Protein. **5** Die Rab-vermittelte Bindung des Transportvesikels an die Akzeptormembran wird möglicherweise über einen Effektor vollzogen. **6** Die GTP-Hydrolyse wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) vermittelt, einhergehend mit der Fusion der Vesikelmembranen. **7** Unter Beteiligung von GDI leitet die Dissoziation des Rab-GDP von der Membran einen weiteren Zyklus ein.

Zahlreichen weiteren Mitgliedern der Rab Familie ist eine spezifische Lokalisation und Funktionalität nachgewiesen worden: Rab4 und Rab11 finden sich ebenfalls in frühen, Rab7 und Rab9 in späten Endosomen. Rab4 rezykliert von den sortierenden Endosomen an die Plasmamembran (Van der Sluijs et al., 1992; Daro et al., 1996). Rab11 ist mit dem rezyklierenden Kompartiment, aber auch mit dem trans-Golgi Netzwerk assoziiert (Ullrich et al., 1996). Rab7 reguliert den Membrantransport von späten Endosomen zu Lysosomen (Feng et al., 1995). Neben der Biogenese von Lysosomen (Riederer et al., 1994) vermittelt Rab9 auch den Transport von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren später Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk (Lombardi et al., 1993). Rab1, Rab2 und Rab6 sind an diversen biosynthetischen Prozessen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates beteiligt. Auch diesen Rab Proteinen werden mögliche Effektoren zugeordnet: Raphilin (Shirataki et al., 1993; Mizoguchi et al., 1994) erkennt die GTP-gebundene Form von Rab3 (Yamaguchi et al., 1993). Andere Proteine interagieren mit den aktivierten Formen von Rab6, Rab8 und Rab9 (Peränen et al., 1996).

#### 1.2.4.3. ARFs

In der Zelle werden zwei Gruppen umhüllter Vesikel unterschieden, welche für den intrazellulären Membranverkehr von wesentlicher Bedeutung sind: Die bereits beschriebenen Clathrin-umhüllten Vesikel sind an der Endocytose an der Zellmembran, aber auch an der Exocytose am Golgi-Apparat beteiligt. Desweiteren finden sich sogenannte COP (coat proteins)-umhüllte Vesikel (Kreis u. Pepperkok, 1994; Schekman u. Orci, 1996). Sie vermitteln den Transport zwischen ER und Golgi sowie innerhalb des Golgi-Apparates. Die Formation der Clathrin- bzw. COP-Hüllen und somit die Entstehung von Transportvesikeln wird durch ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs) reguliert. In dieser Gruppe von sechs GTP-Bindungsproteinen ist das ARF1 das am besten charakterisierte Mitglied. ARF1 ist am Golgi-Apparat lokalisiert und direkt an der Bildung von COP-Hüllen beteiligt (Ktistakis et al., 1996; Spang et al., 1998). Zur Ausübung seiner Funktion durchläuft ARF1 einen GTP-abhängigen Zyklus: GDP-gebundenes ARF1 findet sich inaktiv im Cytosol. Der Austausch von GDP/GTP führt zur Konformationsänderung des ARF1, welche eine N-terminale Interaktion mit Golgi-Membranen ermöglicht (Paris et al., 1997). Diese führt zur Anlagerung von COPs an die Membranen und zur Bildung der Hüllstrukturen (Chavrier u. Goud, 1999). Die Dissoziation des ARF1 von den Golgi-Membranen erfolgt unter GTP-Hydrolyse durch spezifische GTPase aktivierende Proteine (Moss u. Vaughan, 1998).

Bei der Bildung von Clathrinhüllen kontrollieren die ARFs die Rekrutierung der Adapter-Proteine. ARF1 rekrutiert AP1 und AP3 an der Membran des trans-Golgi-Netzwerkes (Rothman, 1996; Ooi et al., 1998). An der Plasmamembran konnte die Lokalisation von ARF6 nachgewiesen werden (D'Souza-Schorey et al., 1994). Er pendelt zwischen Membran und rezyklierenden Endosomen (D'Souza-Schorey et al., 1998) und steuert abhängig von seinem Nukleotidstatus Recyclingprozesse (Radhakrishna u. Donaldson, 1998).

#### 1.2.4.4. Phosphoinositide

Phosphoinositide sind an der cytoplasmatischen Oberfläche zellulärer Membranen lokalisiert. Sie entstehen aus der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol und bilden die Substrate zahlreicher Enzyme wie Phosphatidylinositolkinasen, Phosphatasen, Phospholipase C und D (Fruman et al., 1998; Robinson u. Martin, 1998). Neben ihrer Rolle in der Signaltransduktion präsentieren sich die Inositolpolyphosphate als wichtige endocytotische Regulatoren der Vesikelformation und Fusion. Phosphoinositide steuern die Konzentration von Rezeptoren in Clathrin-coated pits und deren Organisation. Diese Prozesse werden durch Bindung von 4,5'-Phosphoinositiden an  $\beta$ -Arrestin (Gaidarov et al., 1999) bzw. AP2 (Jost et al., 1998) reguliert. Außerdem vermitteln 4,5'-Phosphoinositide durch Modifikation der Membrankomposition oder durch Interaktion mit Hüllproteinen die Bildung umhüllter Transportvesikel (Matsuoka et al., 1998; Corvera et al., 1999). Die Dynamin-vermittelte Ablösung umhüllter Vesikel von der Membran wird durch Entzug von 4,5'-Phosphoinositiden inhibiert (Jost et al., 1998; Achiriloaie et al., 1999; Lee et al., 1999; Vallis et al., 1999).

Die Bedeutung der 3'-Phosphoinositide bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose haben mit der Identifikation eines direkten Interaktionspartners zugenommen: Das frühe endosomale Autoantigen1 (EEA1) bindet spezifisch 3'-Phosphoinositide über eine Zink-bindende Domäne (FYVE-Finger) in vitro und in vivo (Gaullier et al., 1998). EEA1 spielt eine entscheidende Rolle in der Fusion von Endosomen.

#### 1.3. Annexine

Annexine bilden eine Familie hochkonservierter Proteine mit der Fähigkeit der Kalzium-abhängigen Phospholipidbindung (Gerke u. Moss, 1997). Mindestens zehn verschiedene Mitglieder sind in Säugetieren identifiziert worden, davon einige in mehreren Isoformen (Morgan u. Fernandez, 1997). Vertreter der Annexinfamilie finden sich in nahezu allen Zelltypen und stellen oftmals mehr als 1 % des Zellproteins. Neben verschiedensten biologischen Funktionen wird heute vor allen Dingen eine regulatorische Rolle der Annexine im intrazellulären Membranverkehr diskutiert.

#### 1.3.1. Molekulare Struktur

### 1.3.1.1. Kerndomänen und Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen

Annexine bestehen aus einem konservierten Proteinkern und einem kurzen, variablen N-terminalen Anteil (Moss et al., 1991). Mit Ausnahme von Annexin VI besteht der Proteinkern aus vier homologen Repeats ("Core"-Domänen) von jeweils 70-80 Aminosäuren (Haigler et al., 1989; Smith u. Moss, 1994). Die Domänen formieren sich zu einer gewölbten Scheibe, deren Zentrum eine hydrophile Pore bildet. Die zyklische Anordnung der Kerndomänen wird durch Wechselwirkungen hydrophober Seitenketten ermöglicht (Liemann u. Huber, 1997). Eine Annexin-Domäne besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices (A-E), welche durch kurze Schleifen verbunden sind (Liemann u. Huber, 1997). In den Schleifen zwischen Helix A und B, bzw. D und E besitzt jede Kerndomäne potentielle Kalziumbindungsstellen. Bei der Typ II Bindungsstelle interagiert ein Ca<sup>2+</sup>-Ion mit der Sequenz Gly-X-Gly-Thr der Peptidschleife zwischen A und B und einer 38 Aminosäuren entfernten Carboxylgruppe der Schleife zwischen D und E (G-X-G-T-{38}-[D/E]) (Huber et al., 1992). Das Kalzium ermöglicht über einen Brückenmechanismus die Bindung der Annexine an vornehmlich negativ geladene Phospholipide der cytosolischen Membranschicht (Newman et al., 1989; Swairjo et al., 1995).



#### Abb. 1.4.: Schematische Darstellung von Annexin VI

Die acht Kerndomänen (jeweils ~ 70 Aminosäuren) setzen sich aus je fünf α-Helices (A-E) zusammen. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Domänen I/IV, II/III, V/VIII und VI/VII sorgen für enge Interaktion der Segmente. Im jeweiligen Zentrum der zyklisch angeordneten Domänen findet sich eine hydrophile Pore (grau). Eine Verbindungshelix aus 49 Aminosäuren zwischen den Domänen IV und V ermöglicht die Rotation der beiden Hälften um 90° zueinander. Salzbrücken und Wechselwirkungen mit der Verbindungshelix stabilisieren die Interaktion von den Domänen III und IV der ersten Hälfte mit den Domänen VII und VIII der zweiten Hälfte. Der N-terminale Anteil von Annexin VI besteht aus 21 Aminosäuren.

Ein komplexes Bindungsverhalten zeigt Annexin VI (Abb. 1.4.). Sein Proteinkern besteht durch Genduplikation aus zwei fast identischen Hälften mit jeweils vier "Core"- Domänen (Crompton et al., 1988a; Benz et al., 1996). Eine 49 Aminosäuren lange Verbindungshelix ermöglicht die koplanare Bindung beider Hälften an Membranen (Zaks u. Creutz, 1991). Das Protein ist somit in der Lage, Kalzium-abhängige Kontakte über zwei Membranen hinweg zu vermitteln (Liemann u. Huber, 1997). In der Kalzium-gebundenen Form des bovinen Annexin VI Proteins finden sich dabei fünf Ca<sup>2+</sup>-Ionen an den A/B- und eines an der D/E-Schleife (Avila-Sakar et al., 1998). In vivo bildet Annexin VI bei der Kalzium-abhängigen Bindung an Membranphospholipide (Moss et al., 1988; Südhof et al., 1988; Crompton et al., 1988b) eine trimerische strukturelle Einheit (Newman et al., 1989; Driessen et al., 1992).

Neben dieser Kalzium-vermittelten Bindung an intrazelluläre Membranen (Barel et al., 1991; Meers et al., 1991) werden für Annexin VI (Turpin et al., 1998), ebenso für Annexin I und II (Futter et al., 1993; Jost et al., 1997), auch Kalzium-unabhängige Membraninteraktionen beschrieben.

#### 1.3.1.2. N-terminale Domäne

Während der konservierte Proteinkern den Großteil der strukturellen und biochemischen Eigenschaften vermittelt, wird die funktionelle Spezifität der Annexine vermutlich durch die N-terminale Domäne determiniert (Crompton et al., 1988a). Die Sequenzen dieser Domäne sind hoch variabel und ihre Länge liegt in der Regel zwischen 11 und 21 Aminosäuren. Ihre regulatorische Funktion verdeutlicht ein chimerisches Protein aus der N-terminalen Domäne von Annexin I und dem Proteinkern von Annexin V. Dieses erlaubt eine Annexin I-abhängige Regulation von Annexin V (Andree et al., 1993). Die N-terminale Domäne von Annexin I und II beeinflußt das Kalzium- und Phospholipid-bindungsverhalten der beiden Proteine (Powell u. Glenney, 1987; Ando et al., 1989; Wang u. Creutz, 1994).

Annexin I und II sind als Substrate von EGF-, PDGF- und Insulinrezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen identifiziert worden. Außerdem unterliegen einige Annexine der Phosphorylierung durch Serin/Threonin-Kinasen wie Proteinkinase C und A (Rothhut, 1997). Die Phosphorylierung des N-terminalen Tyrosin (De et al., 1986; Futter et al., 1993) bzw. Serin (Wang u. Creutz, 1994) von Annexin I verändert dessen Kalziumbindungs- und Vesikelaggregationseigenschaften (Schlaepfer u. Haigler, 1987). Die Phosphorylierung des Tyrosin am N-Terminus verringert die Affinität von Annexin II zu Phospholipiden (Brambilla et al., 1991). Die Modifikation via Proteinkinase C verändert das Verhalten von Annexin II in der Lipidvesikelaggregation (Johnstone et al., 1992). Die Modifikationsstellen des ebenfalls N-terminal phosphorylierbaren Annexin VI konnten bisher nicht eindeutig definiert werden (Moss et al., 1992). Ein Tyrosin als zehnte und ein Serin als dreizehnte Aminosäure bieten sich als potentielle Phosphorylierungsstellen an (Fan et al., 1995). Annexin VI bindet zwar an die Proteinkinase C  $\alpha$ , eine entsprechende Phosphorylierungsstelle ist jedoch bisher nicht detektiert worden (Schmitz-Pfeiffer et al., 1998).

#### 1.3.2. Intrazelluläre Lokalisation

Die Kalzium-abhängige Phospholipidbindung und die spezifische Lokalisation der einzelnen Annexine variiert zwischen verschiedenen Zelltypen und innerhalb. Mögliche Isoformen und Konformationsänderungen erschweren die biochemische Lokalisierung. Tabelle. 1.1. nennt Beispiele für die beschriebene Lokalisation einzelner Annexine. Verschiedene Annexine können in Kompartimenten des exocytotischen und/oder endocytotischen Membranverkehrs identifiziert werden.

Annexin	Lokalisation	Referenz
Annexin I	Plasmamembran, frühe Endosomen	Seemann et al., 1996b
	spätes endosomales Kompartiment	Futter et al., 1993
Annexin II	Plasmamembran, frühe Endosomen	Emans et al., 1993; Harder et al., 1997
	Caveolae	Harder u. Gerke, 1994
	sekretorische Vesikel	Nakata et al., 1990; Senda et al., 1994
Annexin III	Plasmamembran, Membranen intrazellulärer Granula/Phagosomen	Le-Cabec u. Maridonneau-Parini, 1994
Annexin IV	basolaterale und/oder apikale Membran pola-	Massey et al., 1991; Mayran et al., 1996;
	risierter Epithelzellen	Massey-Harroche et al., 1995; Kojima et
		al., 1994
Annexin V	Plasmamembran, Endoplasmatisches Reti-	Spreca et al., 1992; Giambanco et al.,
	kulum	1993
Annexin VII	Membranen intrazellulärer Granula (Neben- nierenrinde)	Kuijpers et al., 1992
	Plasmamembran (gestreifte Muskulatur)	Selbert et al., 1995
Annexine	noch nicht exakt definiert	
VIII, IX, X		
Annexin XI	Nukleus	Mizutani et al., 1992 und 1995
Annexin XIII	apikaler Bürstensaum von Enterocyten	Wice u. Gordon, 1992

#### Tab. 1.1.: Intrazelluläre Lokalisation der Annexine

Die Tabelle gibt Beispiele für die intrazelluläre Lokalisation der Mitglieder der Annexin Familie. Eine Zusammenfassung sämtlicher Literaturdaten würde den Rahmen dieser Tabelle weit überschreiten.

Die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI wird kontrovers diskutiert: Abhängig vom Zelltyp findet es sich an der Plasmamembran (Tagoe et al., 1994; Weinman et al., 1994; Bandorowicz et al., 1992), am endoplasmatischen Retikulum (Rainteau et al.,

1995) und in Mitochondrien von Hepatocyten (Hazarika et al., 1991). In zahlreichen Zellen wird Annexin VI an der Plasmamembran und in exo- oder endocytotischen Vesikeln angetroffen (Gerke u. Moss, 1997).

### 1.3.3. Eigenschaften und mögliche Funktionen

Die Beteiligung der Annexine an unterschiedlichsten physiologischen Prozessen wie Membranverkehr, Anti-Inflammation, Blutkoagulation, Cytoskelettorganisation, Zelldifferenzierung, Zellwachstum, DNA-Replikation, Signaltransduktion und Ionenkanalregulation erschwert ihre Identifikation in vivo (Raynal u. Pollard, 1994; Mollenhauer, 1997). Aufgrund überlappender Aktivitäten ist es noch schwierig, individuellen Mitgliedern der Annexin-Familie eine eindeutige Funktion zuzuweisen. Obwohl derzeit die Beteiligung der Annexine an Prozessen des Membranverkehrs im Vordergrund steht, soll im folgenden auch kurz auf weitere Eigenschaften eingegangen werden.

#### 1.3.3.1. Proteininteraktionen

Zahlreiche Proteine sind in den letzten Jahren als Interaktionspartner von Annexinen beschrieben worden. Dabei gehen einige Kalzium-bindende Proteine der S-100 Familie Komplexbildungen mit Annexinen ein. Ein Dimer vom S-100-Protein p11 (S100A10) verbindet zwei Annexin II-Moleküle und bildet so ein Annexin II-p11-Heterotetramer (Gerke u. Weber, 1985; Johnsson et al, 1988; Becker et al., 1990). Die Formation des Komplexes erhöht die Kalzium- und Phospholipidaffinität (Powell u. Glenney, 1987; Drust u. Creutz, 1988) und steuert die subzelluläre Lokalisation des Annexin II (Thiel et al., 1992). Auch andere Annexine wie Annexin I (Tokumitsu et al., 1992), Annexin VI (Garbuglia et al., 1998) und Annexin XI (Seemann et al., 1996a) binden an ihrer N-terminalen Domäne dimerische S-100-Proteine. Die Komplexbildung zwischen Annexin I und S100A11 inhibiert die Phosphorylierung von Annexin I (Mailliard et al., 1996). Die Bindung von Annexin VI an S100A1- und S100B-Proteine scheint die Aktivität der S-100-Proteine zu regulieren.

Einige Bindungspartner deuten auf eine Interaktion der Annexine mit dem Cytoskelett hin: Annexin I, II und VI binden Aktinfilamente (Glenney et al., 1987; Gerke u. Weber, 1984; Hayashi et al., 1989). Annexin II bindet, wie auch Annexin VI (Watanabe et al., 1994), an Spektrin des submembranösen Cytoskeletts (Gerke u. Weber, 1984). Diese Interaktionen scheinen von besonderer Bedeutung für die Regulation des Membranverkehrs zu sein.

Die extrazelluläre Lokalisation einiger Annexine führt zu einer großen Anzahl weiterer Interaktionspartner: Hierzu zählen unter anderem Kollagene (Von der Mark u. Mollenhauer, 1997), t-PA (tissue plasminogen activator) (Hajjar et al., 1994; Cesarman et al., 1994) und Apolipoprotein A-I (Brownawell u. Creutz, 1996). Ein verläßliches Modell von der Sekretion der Annexine ist derzeit nicht vorhanden.

#### 1.3.3.2. Zellwachstum und Zelldifferenzierung

Die Expression der Mitglieder der Annexinfamilie unterscheidet sich in verschiedenen Zelltypen: Während Annexin I, II und VI ubiquitär exprimiert werden, finden sich Annexin VIII und XIII nur in wenigen Zellen. Die Höhe der Expression korreliert oftmals mit dem Differenzierungsgrad der Zellen: Während der Entwicklung von T- und B-Lymphocyten erfolgt eine differenzierungsabhängige Hochregulation der Annexin VI-Expression (Clark et al., 1991). Dasselbe Phänomen wird für Annexin II bei der stimulierten Differenzierung von Phäochromocytomzellen beobachtet (Schlaepfer u. Haigler, 1990; Fox et al., 1991). Das Expressionsniveau der Annexine ist nicht nur abhängig von der Differenzierung, sondern auch von der Wachstumsphase der Zellen (Schlaepfer u. Haigler, 1990).

Die Expression bestimmter Annexine inhibiert die Zellwachstumsrate: In der Gegenwart von Annexin I unterliegt die Wachstumsrate von A549 Adenokarzinomzellen einer dramatischen Reduktion (Croxtall u. Flower, 1992; Croxtall et al., 1993). Die stabile Transfektion von Annexin VI inhibiert das Wachstum von A431 Karzinomzellen (Theobald et al., 1994). Annexin VI beeinflußt Zellwachstumsprozesse möglicherweise durch Interaktion mit dem Ras GTPase aktivierenden Protein P120<sup>GAP</sup>, das eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation spielt (Davis et al., 1996; Chow u. Gawler, 1999).

#### 1.3.3.3. Ionenkanäle

Eine Funktion der Annexine als Ionenkanal wird kontrovers diskutiert. In vitro-Experimente beschreiben die Formation von Annexin V, VI und VII zu hochselektiven Kalziumkanälen (Pollard u. Rojas, 1988; Rojas et al., 1990; Benz et al., 1996). Einerseits wird die hydrophile Pore im Zentrum der zyklisch angeordneten Kerndomänen als Ionenkanal vorgeschlagen (Huber et al., 1990; Berendes et al., 1993a). Im Falle von Annexin XII lagern sich sechs Moleküle zu einem Hexamer zusammen und bilden eine Membran-überspannende Pore (Luecke et al., 1995). Neben ihrer eigenen intrinsischen Kanalaktivität scheinen Annexine auch als Modulatoren anderer Ionenkanäle zu fungieren (Diaz-Munoz et al., 1990). Die Überexpression von Annexin VI in transgenen Mäusen führt zu einer Suppression der Kalziummobilisation in Herzmuskelzellen (Gunteski-Hamblin et al., 1996).

#### 1.3.3.4. Membrankomposition

Annexinen wird eine mögliche Rolle in der Membranorganisation zugedacht. Die Kalzium-abhängige Bindung an negativ-geladene Phospholipide könnte eine Beeinflussung der Membrankomposition und eine Stabilisierung von Membrandomänen zur Folge haben (Bazzi u. Nelsestuen, 1992; Junker u. Creutz, 1993). Als Beispiel kann der Annexin II<sub>2</sub>-p11<sub>2</sub>-Komplex angeführt werden, welcher im submembranösen Cytoskelett die Aktin-Filamente mit Cholesterol-reichen Membrandomänen verbindet (Harder et al., 1997).

#### 1.3.3.5. Exo- und endocytotischer Membranverkehr

Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren eine Involvierung der Annexine in den intrazellulären Membranverkehr zeigen können. Annexine sind in der Lage, zwei Membranen über eine bivalente Aktivität Kalzium-abhängig zusammenzuziehen (Creutz, 1992). Neben Annexin VII (Creutz, 1992) und Annexin XIII (Fiedler et al., 1995) sind besonders die Annexine I und II für den primären Membrankontakt und die Fusion exocytotischer Vesikel verantwortlich: Annexin I bindet an Membranen sekretorischer Granula und fördert Kalzium-abhängig ihre Aggregation (Creutz et al., 1987). Die Phosphorylierung von Annexin I reguliert die Glucose-induzierte Insulinsekretion und ist an der Translokation Insulinhaltiger Granula beteiligt (Ohnishi et al., 1995). Annexin II ist ein Mediator der exocytotischen Sekretion von Granulainhalten in Zellen des Nebennierenmarks (Donnelly u. Moss, 1997), wobei es während dieses Prozesses translo-ziert (Chasserot-Golaz et al., 1996).

Zahlreiche Studien deuten zudem auf eine wichtige Rolle der Annexine in der Endocytose hin. Verschiedene Annexine sind in unterschiedliche Schritte des endocytotischen Membranverkehrs involviert. Hierbei assoziieren sie mit endocytotischen Kompartimenten. Besonders ausgiebig ist dieses Phänomen am Annexin II studiert worden: Annexin II und sein Ligand p11 assoziieren mit frühen Endosomen (Harder u. Gerke, 1993) und sind direkt an deren Fusion beteiligt (Emans et al., 1993; Mayorga et al., 1994). Die intrazelluläre Lokalisation der frühen Endosomen ist dabei von der hochaffinen Bindung mit dem Annexin II<sub>2</sub>-p11<sub>2</sub>-Komplex abhängig (Harder u. Gerke, 1993). Neben dem Annexin II ist auch das Annexin I ein endocytotischer Mediator: Annexin I findet sich in multivesikulären Körperchen des späten endosomalen Kompartiments und vermittelt deren Formation (Haigler et al., 1987; Futter et al., 1993). In BHK-Zellen lokalisiert Annexin I nicht an multivesikulären Körperchen, assoziiert jedoch mit den Membranen früher Endosomen (Seemann et al., 1996b).

#### 1.3.4. Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose

Das ubiquitär exprimierte Annexin VI (Kaetzel et al., 1994b) ist während der Evolution aus einer Genduplikation entstanden und somit ein einzigartiges Mitglied der Annexin-Familie (Dedman u. Kaetzel, 1992). Die Domänen I, II, IV und V, VI, VIII weisen eine Sequenzidentität von 55 %, die Domänen III und VII von 27 % auf (Avila-Sakar et al., 1998). Die höchsten Konzentrationen liegen in Leberzellen, endokrinen Zellen, Skelettund Herzmuskelzellen vor (Silva et al., 1986; Smith u. Dedman, 1986; Clark u. Moss, 1991). Alternatives RNA-Splicing resultiert in einer Doppelbande des 68 kD Proteins, welche auf einen Unterschied von sechs Aminosäuren zurückzuführen ist (Moss u. Crumpton, 1990). Im Gegensatz zur prädominanten größeren Splice-Variante weist die kleinere vermutlich kein Annexin VI spezifisches Verhalten auf (Fleet et al., 1999). Die unterschiedlichsten in vitro-Beobachtungen deuten auf eine Beteiligung des Annexin VI an Prozessen wie Inhibition der Phospholipase A<sub>2</sub> (Edwards u. Crumpton, 1991), Antikoagulation (Yoshizaki et al., 1992), Modulation von Kalziumkanälen (Diaz-Munoz et al., 1990) und Inhibition der Proteinkinase C (Shibata et al., 1992). Seit einigen Jahren verdichten sich jedoch Hinweise auf eine Rolle von Annexin VI als Regulator

der Rezeptor-vermittelten Endocytose.

24

#### 1.3.4.1. Annexin VI als Marker hepatocytischer Endosomen

1994 ist der Arbeitsgruppe von Stefan Jäckle die Identifikation von Annexin VI als Markerprotein hepatocytischer Endosomen gelungen (Jäckle et al., 1994). Drei funktionell verschiedene endosomale Fraktionen sind aus der Rattenleber isoliert worden: Das Kompartiment der Dissoziation von Rezeptoren und Liganden (CURL), das Rezeptorrezyklierende Kompartiment (RRC) und das prälysosomale Kompartiment (hier: MVB). Das prominenteste Protein gereinigter Membranen dieser drei Kompartimente weist eine Größe von 68 kD auf. Zu 96 % bzw. 91 % ist es mit Sequenzen von Maus Annexin VI und humanem Annexin VI identisch. Spezifische Antiseren identifizieren dieses Protein als Annexin VI. Zusätzlich findet sich Annexin VI noch in Golgi-Membranen und in geringen Mengen in Lysosomen und Plasmamembranen. Die Solubilisierung von Annexin VI aus den endosomalen Membranen durch EGTA bestätigt die Kalziumabhängigkeit dieser Assoziation. Die Lokalisation von Annexin VI an der cytosolischen Membranseite wird durch Degradation des gesamten Annexin VI durch Pronase belegt. Diese läßt luminales Protein im Inneren der Endosomen unangetastet. Die hohe Konzentration von Annexin VI in CURL, RRC und MVB deutet auf eine Rolle im endocytotischen Membranverkehr oder in Sortierungsprozessen endosomaler Membranproteine hin. Die endosomale Lokalisation von Annexin VI ist immunelektronenmikroskopisch an Rattenhepatocyten bestätigt und quantifiziert worden (Ortega et al., 1998). Annexin VI findet sich colokalisiert mit Rab5 ausschließlich in endosomalen Strukturen vor allem des apikalen Kompartiments.

#### 1.3.4.2. Annexin VI als Vermittler der coated Vesikel-Formation

1991 haben Lin et al. ein in vitro-System zum Studium der Formation von Clathrin-umhüllten Vesikeln etabliert (Lin et al., 1991). Hierbei erweist sich Annexin VI gemeinsam mit Kalzium, ATP und weiteren cytosolischen Faktoren als essentiell zur Ablösung von Vesikeln aus isolierten Plasmamembranen (Lin et al., 1992). Da kein anderes Annexin die Formation umhüllter Vesikel aktiviert, deutet dieses auf eine Spezifität des Annexin VI in diesem Prozeß hin. Dabei ermöglicht die Interaktion von Annexin VI und cytoskelettalen Komponenten die Ablösung der Vesikel von der Plasmamembran. Analog zur Exocytose (Aunis u. Bader, 1988; Perrin et al., 1987; Trifaro et al., 1993) scheint die Umbildung des Cytoskeletts auch der endocytotischen Aufnahme vorauszugehen: 1998 hat eine Arbeitsgruppe um Richard Anderson gezeigt, daß die Bindung von Annexin VI an die N-terminale 28 kD-Domäne von β-Spektrin (Watanabe et al., 1994) die Formation umhüllter Vesikel fördert (Kamal et al., 1998). Spektrin-gebundenes Annexin VI reguliert die Umbildung des Cytoskeletts über die Aktivierung der Cysteinprotease Calpain I. Diese spaltet membrangebundenes Spektrin und leitet die Ablösung von Vesikeln ein. Der Mechanismus ist durch Zugabe des Cysteinprotease-Inhibitors ALLN (N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal) inhibierbar. Nach einiger Zeit sind die Zellen jedoch in der Lage, durch alternative Mechanismen wieder coated pits zu formieren. Die Annexin VI-unabhängig entstandenen Endosomen sind kleiner und von einheitlicher Größe. Im Gegensatz zu Annexin VI-abhängigen Endosomen weisen sie keine perinukleäre Anreicherung auf, sondern sind über die Zelle verteilt lokalisiert. In diesen ALLN-behandelten Zellen ist die Degradation aufgenommener LDL deutlich inhibiert. Die Annexin VI-unabhängig entstandenen, mislokalisierten Endosomen können nicht in das Zellzentrum wandern und somit nicht mit Komponenten des späten endosomalen Kompartimentes fusionieren. Dieses führt zu einer dramatischen Störung der Verstoffwechselung von LDL. Diesem Phänomen könnten fehlende Interaktionen von Annexin VI oder Spektrin (Holleran et al., 1996) mit dem Cytoskelett bzw. diesem assoziierte Proteine zugrundeliegen. Neben ALLN reduziert auch die Mikroinjektion einer dominant-negativen Annexin VI-Mutante, welche die Aktivität des Wildtyps inhibiert, die Aufnahme und Degradation von LDL deutlich. Annexin VI steuert somit über eine Cysteinprotease Umbauprozesse des Cytoskeletts, die an der Formation umhüllter Vesikel und an dem weiteren Stoffwechselweg der Endosomen beteiligt sind. Zahlreiche weitere cytoskelettale Proteine wie zum Beispiel Ankyrin (Michaely et al., 1999) könnten an diesen komplexen Wechselwirkungen der Annexin VI-abhängigen Endocytose beteiligt sein. Die Colokalisation von Annexin VI mit einem Markerprotein für prälysosomale und lysosomale Strukturen (lgp120) in NRK-Zellen (Pons et al., 2000) deutet zusätzlich auf eine Spektrin-abhängige Vesikelformation im späten endosomalen Kompartiment hin (Pons et al., 2001). Über die Interaktion mit Spektrin hinaus spricht der Nachweis der Assoziation und Colokalisation von Annexin VI mit Dynamin für eine Rolle in der Formation von coated Vesikeln (Turpin et al., 1998). Dynamin reguliert als GTPase die Ablösung endocytotischer Vesikel von der Plasmamembran. Annexin VI fungiert möglicherweise als Stabilisator der Dynamin/Membran-Interaktion.



Abb. 1.5.: Potentielle Rolle von Annexin VI im intrazellulären Membrantransport

Annexin VI findet sich an der Plasmamembran und in drei endosomalen Fraktionen von Hepatocyten. Über Proteininteraktionen mit Spektrin und Dynamin partizipiert Annexin VI an der Formation umhüllter Vesikel und beteiligt sich an dem Transfer von Liganden zu Lysosomen. Zusätzlich findet sich Annexin VI auch in Caveolae (Schnitzer et al., 1995). Dort ist die Funktion von Annexin VI noch unklar.

#### 1.3.4.3. Annexin VI-unabhängige Endocytose in humanen A431-Zellen

Bei Studien an humanen A431 Karzinomzellen, einem etablierten Modelsystem zur Analyse endocytotischer Mechanismen, ist eine potentielle Rolle des Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose in Frage gestellt worden (Smythe et al., 1994). Southern Blot-Analysen haben gezeigt, daß diese Zellen kein endogenes Annexin VI besitzen (PCR-Amplifizierung der Nukleotide 1186-1840, DNA-Sonde aus den Nukleotiden 1260-1600 humaner Annexin VI cDNA). Die stabile Expression von Annexin VI in A431-Zellen beeinflußt weder Aufnahme noch Recycling von Transferrin. Die Formation umhüllter Vesikel in permeabilisierten A431-Zellen (Schmid u. Smythe, 1991) wird durch Annexin VI ebenfalls nicht gefördert. Aufgrund dieser Beobachtungen haben Smythe und Mitarbeiter Annexin VI als essentielle endocytotische Komponente ausgeschlossen. Da Annexine eine hohe Spezifität aufweisen und nicht in allen Zelltypen gleichermaßen exprimiert werden, muß jedoch die spezifische Aktivität eines bestimmten Annexins nicht in jeder Zelle erforderlich sein. Die Entwicklung eines alternativen Mechanismus zur Stachelsaumvesikel-Formation nach Inhibition der Annexin VI/Spectrin-Interaktion kann diese Theorie bestätigen (Kamal et al., 1998). Anscheinend ist Annexin VI nur in bestimmten Zellen ein essentieller Bestandteil der Rezeptorvermittelten Endocytose.

#### 1.4. Stoffwechsel der Lipoproteine

Die ubiquitär im Planzen- und Tierreich verbreiteten Lipide dienen dem Organismus als Energieträger und Partizipienten an zahlreichen physiologischen Stoffwechselvorgängen. Die primär wasserunlöslichen Lipide werden im Blutplasma an spezifische Apolipoproteine gebunden als Lipoproteine transportiert. Dieses ermöglicht die Versorgung der Gewebe mit Fettsäuren und Cholesterin. Die Endocytose von Lipoproteinen wird umfassend untersucht. Die Aufnahme von LDL präsentiert sich dabei als das Modell der Rezeptor-vermittelten Endocytose (Goldstein et al., 1985). Aufgrund des Zusammenhangs von Dysregulationen der Endocytose von Lipoproteinen mit arteriosklerotischen Veränderungen ist diesem Stoffwechsel höchste klinische Aufmerksamkeit zu widmen.

#### 1.4.1. Einteilung und Eigenschaften der Lipoproteine

Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Kern aus Cholesterinestern und Triglyzeriden, der von einer äußeren Hülle aus Phospholipiden, Cholesterol und Proteinen umgeben wird. Die humanen Lipoproteinklassen unterscheiden sich in Molekülgröße, Lipidzusammensetzung, Ladung, Dichte und Proteinkomponenten. Letztere werden als Apolipoproteine bezeichnet. Neben ihrer hohen Affinität zu Lipiden sind sie in der Lage, Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Außerdem verfügen sie über Strukturen zur spezifischen Wechselwirkung mit Rezeptoren von Zellen der Körperperipherie oder der Leber. Lipoproteine lassen sich in einem Kaliumbromid Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation voneinander trennen (Havel et al., 1953; Gofman et al., 1954): Nach steigender Dichte werden sie als Chylomikronen, VLDL (Very Low Density Lipoproteins), IDL (Intermediate Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) und HDL (High Density Lipoproteins) bezeichnet. Tabelle 1.2. gibt einen Überblick über die physikalischen Charakteristika und Apolipoproteine der einzelnen Lipoproteinklassen. Abb. 1.6. verdeutlicht ihre unterschiedliche Komposition.



#### Abb. 1.6.: Zusammensetzung der Lipoproteine

Die Anteile der Komponenten Triglyzeride (gelb), Phospholipide (grün), Cholesterolester (blau), Cholesterol (rot) und Protein (türkis) sind in % der Lipoprotein-Masse angegeben. Der Triglyzeridanteil korreliert negativ mit der steigenden Dichte, was auf die Veränderungen im Protein/Lipid-Verhältnis zurückzuführen ist. Die Lipidzusammensetzung der Chylomikronen ist abhängig von der aufgenommenen Nahrung. Aufgrund ständigen Transfers von Einzelkomponenten und enzymatischer Modifikation sind lediglich Anhaltswerte der Komposition der dynamischen Partikel angegeben.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte	<0,95	0,95-	1,006-	1,019-	1,063-
[g/ml]		1,006	1,019	1,063	1,21
Molekulargewicht	$5-1000 \times 10^3$	$10-80 \times 10^3$	$5-10 \times 10^3$	$2-3,5x10^{3}$	65-386
[kD]					
Durchmesser	80-1200	28-80	25-35	18-25	6-12
[nm]					
Elektrophor.	Startpunkt	prä-β	Slow prä-β	β	α
Mobilität					
			Katabolismus	Katabolis-	Leber
Herkunft	Dünndarm	Leber	von VLDL	mus von	Dünndarm
				VLDL	
	ApoA-I,-II,-IV,	ApoB <sub>100</sub> ,	ApoB <sub>100</sub> ,		ApoA-I,-II,-IV,
Apolipoproteine	ApoB <sub>48</sub> , ApoE,	ApoE,	ApoE,	$ApoB_{100}$	ApoE,
	ApoC-I,-II,-III	ApoC-I,-II,-III	ApoC-I,-II,-III		ApoC-I,-II,-III

#### Tab. 1.2. : Einteilung, Eigenschaften und Apolipoproteine der Lipoproteinklassen

Die Übersicht orientiert sich an Literaturdaten (Gotto et al., 1986; Dargel, 1991; Kane, 1996). Die Lipoproteine lassen sich aufgrund unterschiedlicher Mobilität im elektrischen Feld auftrennen. Die Mobilitäten entsprechen der elektrophoretischen Plasma-Auftrennung im Agarosegel. Bis auf Apolipoprotein B werden die Apolipoproteine zwischen den einzelnen Fraktionen dynamisch ausgetauscht. Dieses erschwert exakte Angaben über ihre Verteilung.

#### 1.4.2. Exogener Stoffwechselweg

Nahrungslipide werden im Lumen des Intestinums nach Assoziation von Gallensäuren in Form gemischter Micellen emulgiert und durch die Pankreaslipase in ihre Grundmoleküle Fettsäuren, Mono- und Diacylglyzeride degradiert. Cholesterinester werden durch die Cholesterinesterase aus dem Pankreas hydrolysiert. Nach Dissoziation der Gallensäuren und Absorption der Lipide durch die Darmmukosa des Jejunums (Tso u. Balint, 1986) schließt sich im Enterocyten wieder deren Reveresterung an. Nach Fusion von ApoB<sub>48</sub> mit triglyzeridreichen Lipidtropfen vollzieht sich am Golgi-Apparat die Zusammensetzung mit ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV und Phospholipiden zu Chylomikro-
nen. ApoB<sub>48</sub> entsteht aus einer posttranskriptional editierten mRNA für ApoB<sub>100</sub> und entspricht dessen aminoterminaler Hälfte (Powell et al., 1987; Davidson et al., 1995). Die Chylomikronen werden aus dem Enterocyten basolateral sezerniert und über den Lymphweg dem Blutkreislauf zugeführt (Hussain et al., 1996). Nach Sekretion nehmen die Chylomikronen ApoC aus der HDL auf (Mahley u. Hussain, 1991). ApoC-II dient als Kofaktor der endothelialen Lipoproteinlipase (LPL) (LaRosa et al., 1970; Olivecrona u. Bengtsson-Olivecrona, 1993). LPL spaltet, an Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) gebunden, den Triglyzeridanteil der Chylomikronen in Monoglyzeride und freie Fettsäuren (Eisenberg et al., 1992). Die Chylomikronen nehmen zudem ApoE und Cholesterinester aus HDL auf, während sie Phospholipide, ApoA-I und A-IV an HDL abgeben (Vance u. Vance, 1991). Produkt dieser Transformation sind die Chylomikronen-Remnants (CR). Die Lipoproteinlipase löst sich von den HSPG der Endothelzellen (Saxena et al., 1989) und verbleibt an den CR (Goldberg et al., 1986; Zambon et al., 1996). Sie vermittelt anschließend nach Bindung an hepatocytäre HSPG die Aufnahme der CR über das LDL-Rezeptor Related Protein (LRP) in die Leber (Beisiegel et al., 1991). Die ebenfalls an HSPG lokalisierte hepatische Lipase (HL) kann auch als Ligand für die CR-Internalisation fungieren (Beisiegel et al., 1994; Ji et al., 1994). Die größte Bedeutung bei der hepatischen Internalisation von CR hat jedoch die hochaffine Bindung von ApoE an den LDL-Rezeptor und LRP (Beisiegel et al., 1989; Beisiegel, 1995).

## 1.4.3. Endogener Stoffwechselweg

Der endogene Lipoproteinstoffwechsel initiiert vorzugsweise im nahrungsfreien Intervall mit der Bildung von VLDL in der Leber. Diese versorgen periphere Gewebe mit Triglyzeriden und mit Cholesterin. Beim Menschen enthält naszierende VLDL ApoB<sub>100</sub>, aber kein ApoB<sub>48</sub> (Ginsberg, 1995). Nach Komplexierung von ApoB<sub>100</sub> mit Lipiden am ER der Hepatocyten werden VLDL-Partikel über den Disse'schen Raum in die Zirkulation sezerniert (Gibbons, 1990; Vance u. Vance, 1990). Hier nehmen die VLDL weitere ApoE und ApoC aus HDL auf. 90 % der Triglyzeride der VLDL werden durch die endothelständige Lipoproteinlipase hydrolysiert: Große VLDL<sub>1</sub> werden somit zu kleinen VLDL<sub>2</sub> und schließlich zu IDL umgewandelt (Griffin u. Packard, 1994). Diese werden nun entweder, wie auch VLDL<sub>2</sub>, ApoE-vermittelt über den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen (Havel u. Hamilton, 1988) oder durch die LPL (Ginsberg, 1994) und vor allen Dingen die hepatische Lipase (Goldberg et al., 1982) weiter hydrolysiert. Die intravaskuläre Metabolisierung von IDL zu LDL beeinhaltet neben einer Verminderung der Triglyzeride den vollständigen Verlust von ApoE und ApoC.

## 1.4.4. Reverses Cholesterintransportsystem

Die Leber ist das einzige Organ, welches Cholesterin entweder direkt oder nach Umbau zu Gallensäuren ausscheiden kann. Aus der Peripherie muß Cholesterin deshalb revers zur Leber transportiert werden. Als extrazelluläre Akzeptoren sind hieran maßgeblich die Plasma-HDL beteiligt (Barter, 1993), welche der Dünndarmmukosa, der Leber und der Lipolyse von Chylomikronen und VLDL entstammen. Das Cholesterin peripherer Zellen assoziiert mit HDL und wird auf diesen durch die Lezithin:Cholesterin Acyl-transferase (LCAT) verestert (Ishida et al., 1990). Es sammelt sich nun aufgrund höherer Hydrophobie im Inneren der Partikel an. ApoA-I fungiert als Kofaktor dieser Reaktion (Fielding et al., 1972). Die Cholesterinester können unter Vermittlung des Cholesterolester-Transfer-Proteins (CETP) auf ApoB-haltige Lipoproteine übertragen (Kunitake et al., 1992) und via hepatischer Lipoproteinrezeptoren der Zirkulation entzogen werden (Barter et al., 1982). Über den Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) sind die HDL auch in der Lage, durch direkte Rezeptorbindung Cholesterolester in die Leber zu transferieren (Acton et al., 1996).

## **1.5. Low Density Lipoprotein**

Cholesterin ist ein wesentlicher Strukturbestandteil der Membranen tierischer Zellen und subzellulärer Partikel. Seine Umwandlungsprodukte bilden Gallensäuren, Steroidhormone und Vitamin D<sub>3</sub>. Cholesterin stammt im Organismus zum einen aus der Nahrung, zum anderen aus der endogenen Synthese. Fast alle Gewebe können nach Bedarf Cholesterin synthetisieren, wobei die extrahepatischen Zellen jedoch in der Regel zunächst Cholesterin aus dem Plasma aufnehmen. Beide Prozesse werden von den Zellen durch Sterol-regulierte Bindungsproteine kontrolliert (Brown u. Goldstein, 1997). Die Versorgung der peripheren Gewebe mit Cholesterin aus der Leber gewährleisten die Low Density Lipoproteine. Jedes LDL-Partikel enthält ungefähr 1500 Cholesterolestermoleküle, welche von 800 Phospholipid-, 500 nicht veresterten Cholesterolmolekülen und einem ApoB<sub>100</sub> Molekül umhüllt werden (Brown u. Goldstein, 1986; Deckelbaum et al., 1977; Elovson et al., 1985).

## 1.5.1. LDL-Katabolismus

Die Internalisation von LDL-Partikeln wird in Studien der Nobelpreisträger Goldstein und Brown detailliert beschrieben (Goldstein et al., 1985; Brown u. Goldstein, 1986). Der Großteil der LDL wird durch Bindung des ApoB<sub>100</sub> an den LDL-Rezeptor internalisiert, wovon ungefähr die Hälfte in die Leber, der Rest in extrahepatische Gewebe aufgenommen wird (Brown u. Goldstein, 1986). Nach Rezeptor-vermittelter Endocytose werden die LDL-Komponenten lysosomal hydrolysiert. Die Cholesterolester werden konvertiert und anschließend als freies Cholesterol aus den endocytotischen Kompartimenten freigesetzt (Tabas, 1995; Lange u. Steck, 1996). Das Apolipoprotein wird zu Aminosäuren abgebaut. Der Konzentrationsanstieg von freiem Cholesterol führt zur Aktivierung zellulärer Kontrollwege, welche durch Sterol-regulierte Bindungsproteine (SREBPs) vermittelt werden (Brown u. Goldstein, 1997). Hierbei handelt es sich um die Hemmung der Neusynthese von LDL-Rezeptoren (Brown u. Goldstein, 1975; Russel et al., 1983), die Aktivitätshemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) als Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinsynthese (Luskey et al., 1983; Gil et al., 1985) und die Aktivitätserhöhung der Acyl-CoA: Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zur Speicherung von überschüssigem Cholesterin als Cholesterinester (Goldstein et al., 1974). 80 % der LDL im Plasma werden über die LDL-Rezeptor-vermittelte Endocytose internalisiert. Der Rest folgt dem sogenannten "Scavenger"-Weg (Dietschy, 1984): Hierbei wird LDL über Pinocytose, adsorptive Endocytose über niedrigaffine Rezeptoren und Scavenger-Rezeptoren für spezifisch modifizierte LDL aufgenommen. Letztere finden sich vor allem auf Makrophagen.

## 1.5.2. LDL und arteriosklerotische Läsionen

Defekte im LDL-Rezeptor- bzw. ApoB<sub>100</sub>-Gen oder eine verminderte Expression des LDL-Rezeptors führen zur massiven Akkumulation von LDL im Blutplasma (Hobbs et al., 1992; Goldstein et al., 1995). Diese können nach oxidativer Modifikation von Makrophagen der arteriellen Intima aufgenommen werden. Der Vorgang vollzieht sich über eine Bindung der veränderten ApoB<sub>100</sub>-Moleküle durch die beschriebenen Scavenger-Rezeptoren, die keiner regulativen Beeinflussung durch den Cholesterolgehalt unterliegen. Dieses führt zur Bildung von Schaumzellen und repräsentiert den Beginn arteriosklerotischer Veränderungen (Krieger u. Herz, 1994).

## **1.6. LDL-Rezeptorfamilie**

Die Lipoproteinrezeptoren vermitteln die Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen und ermöglichen einen zielgerichteten Transport. Hierbei determiniert das Expressionsmuster der Rezeptoren das Zielgewebe. Die Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie (Hussain et al., 1999) sind durch eine Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert. Ihr C-Terminus ragt in das Cytoplasma und ihr N-Terminus in den Extrazellularraum. Sie gehören zu den Typ I-Membranproteinen. Alle Mitglieder setzen sich aus definierten Grundmotiven zusammen (Goldstein et al., 1985).

## 1.6.1. Grundmotive

Der Aminoterminus der Lipoproteinrezeptoren enthält Wiederholungen eines vierzig Aminosäuren langen Motivs, welches sechs Cysteine beinhaltet (Yamamoto et al., 1984). Wegen der Strukturhomologie zu verschiedenen Faktoren des Komplementsystemes wird diese Domäne auch als "complement type repeat" bezeichnet (Stanley et al., 1985). Zwischen den Cysteinresten finden sich negativ geladene Aminosäuren mit konservierter Sequenz. Aufgrund der hohen Affinität zu spezifischen Apolipoproteinen bildet dieses Motiv die Ligandenbindungsstelle (Russel et al, 1989).

Ebenfalls Cysteinreiche Motive sind die folgenden "Epidermal Growth Factor repeats", welche eine Homologie mit dem Vorläufer des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) aufweisen (Russel et al., 1984). Zwei EGF-Motive werden vom dritten EGF-Motiv durch eine Spacerregion getrennt. Diese besteht aus fünf Wiederholungen der Sequenz Tyr-Trp-Thr-Asp (YTWD). Der Domäne wird eine Rolle bei der intrazellulären Dissoziation der Liganden vom Rezeptor zugeschrieben (Davis et al., 1987).

Die anschließende 60 Aminosäurensequenz liegt extrazellulär an der Transmembrandomäne und wird als o-gebundene Glykosylierungsdomäne bezeichnet. Die Glykosylierungsstellen werden durch achtzehn Serin- oder Threoninreste gestellt.

Der Transmembrandomäne folgen die cytoplasmatischen Abschnitte der Rezeptoren: Sie besitzen Internalisierungssequenzen, welche für die Aufnahme und das Rezeptorrecycling bedeutend sind (Chen et al., 1990). Die Signalsequenzen werden aus der Aminosäurenfolge Asn-Pro-X-Tyr (NPXY) gebildet.

## 1.6.2. LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist das erste und am besten beschriebene Mitglied dieser Rezeptorfamilie (Brown u. Goldstein, 1974). Er wird in zahlreichen verschiedenen Zelltypen gebildet, mit dem höchsten Expressionsniveau in der Nebennierenrinde und der Leber (Brown u. Goldstein, 1986). Seine Struktur wird in Abb. 1.7. veranschaulicht.

Der LDL-Rezeptor bindet sowohl ApoB<sub>100</sub> aus LDL, als auch ApoE aus Chylomikronen Remnants und IDL. Die mit multiplen Kopien von ApoE ausgestatteten CR und IDL assoziieren mit 20 fach höherer Affinität an den LDL-Rezeptor als LDL, welches lediglich ein ApoB<sub>100</sub>-Molekül besitzt (Innerarity u. Mahley, 1978). Die Assoziation erfolgt über negativ geladene Aminosäuresequenzen des Rezeptors mit komplementären positiv geladenen Apolipoproteinabschnitten (Weisgraber et al., 1983; Hospattankar et al., 1986). Die beiden Apolipoproteine differieren in ihren Bindungseigenschaften am Rezeptor.



#### Abb. 1.7.: Schematisierte Darstellung des LDL-Rezeptors

N-terminal finden sich sieben Kopien der "complement type repeats" (rot). Die repeats drei bis sieben verantworten die Assoziation mit ApoB<sub>100</sub> der LDL (Russell et al., 1989). ApoE weist eine besonders hohe Affinität zu der fünften Wiederholung auf (Innerarity u. Mahley, 1978). Zwei folgende EGF-Motive (blau) werden von einer Spacerregion mit einem weiteren EGF-Motiv verbunden und bilden zusammen eine "EGF precursor homology" Domäne. Diese wird von der aus 22 hydrophoben Resten bestehenden Transmembrandomäne (grün) durch die Domäne mit o-gebundenen Glykosylierungsstellen (gelb) getrennt. Der 50 Aminosäuren lange cytoplasmatische Schwanz enthält ein NPXY-Internalisierungssignal (violett). Das Molekulargewicht des vorläufigen Rezeptorproteins beträgt 120 kD, nach Modifizierung am Golgi-Apparat 160 kD.

Der LDL-Rezeptor ist der Protagonist der Cholesterolhomöostase, da er hauptsächlich für die Regulierung der Aufnahme und des Katabolismus von LDL via ApoB<sub>100</sub> verantwortlich ist (Brown u. Goldstein, 1986). Dieses wird eindrucksvoll durch das Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie belegt, welche in den meisten Fällen auf einen Defekt des LDL-Rezeptors zurückzuführen ist (Goldstein u. Brown, 1975; Goldstein et al., 1995). Diese dominante Erbkrankheit steht im direkten Zusammenhang mit der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit. Der LDL-Rezeptor ist auch an der Internalisierung von Chylomikronen Remnants über ApoE beteiligt. Der Verlust seiner Funktion kann in diesem Prozeß aber kompensiert werden (Kita et al., 1982; Rubinstein 1990; Ishibashi et al., 1994), was die Bedeutung des LDL-Rezeptors im Stoffwechsel der CR in den Hintergrund stellt.

## 1.6.3. Weitere Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie

## 1.6.3.1. LDL-Rezeptor Related Protein (LRP)

Das LDL-Rezeptor Related Protein (Herz et al., 1988) findet sich vor allen Dingen im Leberparenchym (Herz et al., 1988), in Neuronalzellen (Wolf et al., 1992) und in Syncytiotrophoblasten (Jensen et al., 1988). LRP wird mit einem Molekulargewicht von 600 kD synthetisiert. Am Golgi-Apparat erfolgt die Spaltung in zwei Untereinheiten von 85 kD und 515 kD (Herz et al., 1990), welche an der Zellmembran nicht kovalent assoziieren. In vivo Experimente identifizieren LRP als den gesuchten hepatischen CR Rezeptor: Die leberspezifische Inaktivierung von LRP in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen führt zur massiven Akkumulation von Chylomikronen Remnants (Rohlmann et al., 1998). Zuvor haben diverse in vitro Studien auf diese Funktion hingedeutet: LRP bindet ApoE (Beisiegel et al., 1989), erkennt die LPL (Beisiegel et al., 1991; Nykjaer et al., 1993) und vermittelt die Endocytose ApoE angereicherter Lipoproteine (Kowal et al., 1989). Neben Proteinen des Lipoproteinstoffwechsels interagiert LRP mit zahlreichen Liganden wie  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Strickland et al., 1990) und Proteasen des Gerinnungssystems.

## 1.6.3.2. VLDL-Rezeptor und ApoE Rezeptor 2

Der VLDL-Rezeptor gleicht dem LDL-Rezeptor in Sequenz und Struktur am meisten (Takahashi et al., 1992). Der hochkonservierte VLDL-Rezeptor weist jedoch an seiner Ligandenbindungsdomäne acht complement type repeats auf und bindet lediglich ApoE enthaltende Lipoproteine. Der 130 kD große VLDL-Rezeptor (Battey et al., 1994) wird vorwiegend in peripheren Geweben und nur geringfügig in der Leber exprimiert (Webb

et al., 1994). Seine physiologische Funktion ist immer noch unklar: Die Inaktivierung des VLDL-Rezeptors im Knock out-Mausmodell führt zu keiner phänotypischen Veränderung (Frykman et al., 1995). Der Struktur des VLDL-Rezeptors ähnelt der ApoE Rezeptor 2. Dieser findet sich vornehmlich im Gehirn (Kim et al., 1996). Aktuelle Studien bescheinigen dem VLDL-Rezeptor und dem ApoE Rezeptor 2 überlappende Funktionen bei der embryonalen Hirnentwicklung. Die gemeinsame Ausschaltung des VLDL-Rezeptors und des ApoE Rezeptors 2 in Doppel-knock out-Mäusen führt zur massiven Störung der neuronalen Migration (Trommsdorff et al., 1999). Hierbei dienen die beiden Rezeptoren der Transduktion extrazellulärer Signale und vermitteln die Phosphorylierung cytosolischer Proteine (Hiesberger et al., 1999).

## 1.6.3.3. GP 330

Mit ungefähr 600 kD ist das GP 330 (Megalin) das größte Mitglied der LDL-Rezeptorfamilie (Saito et al., 1994). GP 330 spielt eine essentielle Rolle in der embryonalen Hirnentwicklung: GP 330-defiziente Mäuse weisen schwere Vorderhirnschäden auf (Willnow et al., 1996). Da GP 330 in der Lage ist, ApoB<sub>100</sub> zu binden (Stefansson et al., 1995), könnte es embryonale Hirnstrukturen mit LDL Cholesterol versorgen. GP 330 fungiert zudem als Rezeptor zahlreicher Liganden an den proximalen Nieren-Tubuli (Christensen et al., 1998, Nykjaer et al., 1999) und von Thyreoglobulin in der Schilddrüse (Marino et al., 1999). Kürzlich ist GP 330 auch als Rezeptor des atherogenen Lipoprotein(a) in vitro identifiziert worden (Niemeier et al., 1999).

## 1.6.3.4. Andere Lipoproteinrezeptoren

Nicht zur LDL-Rezeptorfamilie gehören die Scavenger Rezeptoren. Die Bedeutung der Scavenger Rezeptoren A (SR-A) bei der Entstehung von Arteriosklerose (Kapitel 1.5.2.) ist in vivo bestätigt worden: SR-A/ApoE Doppel-knock out-Mäuse besitzen 60 % kleinere arteriosklerotische Läsionen als lediglich ApoE-defiziente Artgenossen (Suzuki et al., 1997). Der Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) vermittelt die selektive Aufnahme HDL assoziierter Cholesterylester (Acton et al., 1996). Seine Inaktivierung führt in Mäusen zum dramatischen Anstieg der Plasma-HDL als Folge einer verminderten Aufnahme in die Leber (Rigotti et al., 1997).

## 2. MATERIAL

## 2.1. Zellen und Bakterien

Zur Transformation, Klonierung und Präparation von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien des Stammes E.coli JM 109 (Yanish-Peron et al., 1985) benutzt. Dieser Stamm wurde kommerziell bei der Firma Promega erworben und besaß folgenden Genotyp: *end A1, rec A1, gyr A96, thi, hsd R17, (r<sub>k</sub>-, m<sub>k</sub>+), rel A1, sup E44, \lambda-, \delta (<i>lac-pro AB*), [*F', tra D36, pro AB, lac I*<sup>4</sup> Z  $\delta$  *M15*].

Für transiente Gentransferexperimente wurde die CHO-K1 Zelllinie (Puck et al., 1968) benutzt.

## 2.2. Medien und Material für Zellkulturarbeiten

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
F12 (HAM) Nutrient Mixture	Gibco-Brl
Fötales Kälber Serum (FCS)	Gibco-Brl
L-Glutamin 200mM (100x)	Gibco-Brl
PBS Dulbeccos	Gibco-Brl
Penicillin/Streptomycin 10000 u/ml	Gibco-Brl
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco-Brl
1 ml Cryoröhrchen	Nunc
Mehrfachkulturschalen 6-well	Costar
Mehrfachkulturschalen 12-well	Costar
Petrischalen Ø10 cm	Nunc
15 ml Plastikzentrifugenröhrchen	Falcon/Becton-Dickinson
50 ml Plastikzentrifugenröhrchen	Falcon/Becton-Dickinson
Zählkammer	Thomae
72 cm <sup>2</sup> und 162 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Costar

## 2.3. Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien mit höchstem Reinheitsgrad verwendet.

Acrylamid-Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Boehringer Mannheim
Albumin (2mg/ml)	Pierce
3-Aminopropyltriethoxy Silane (Silane)	Sigma
Ammonium Persulfat (AP)	Bio-rad
Benzamidine	Sigma
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazole (PPD)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma

## Material

Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)
Ficoll (Typ 400-D1)
Gentamycin-Sulfat
Glycerol
Glycin
Hefeextrakt (Yeast Extract)
Heparin
Iodmonochlorid (ICl)
Kaliumacetat (KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )
Kaliumbromid (KBr)
Kaliumchlorid (KCl)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Kaliumjodid (KJ)
Kaliumnatriumtartrat (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> x4H <sub>2</sub> O)
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )
2-Mercaptoethanol
Methanol
Mowiol
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )
Natriumchlorid (NaCl)
Natriumdodecylsulfat (SDS)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na2HPO4x2H2O)
Natronlauge (NaOH)
Non-Fat Dry Milk (Milchpulver)
Paraformaldehyd
Perhydrol 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Poly-L-Lysin hydrobromid (MW 30.000-70.000)
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> )
Salzsäure (HCl)
Saponin
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )
Sucrose
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Trichloressigsäure (TCA)
Trishydroxymethylaminomethane (Tris)
Triton X-100
Trypton
Tween 20

Sigma Sigma Gibco-Brl Sigma Sigma Difco Roche Merck Merck Merck Merck Merck Merck Merck Merck Merck Serva Merck Calbiochem Merck J.T.Baker Serva Merck Merck Bio-rad Sigma Merck Sigma Merck Merck Sigma Merck Merck Bio-rad Merck Sigma Sigma Difco Merck

## 2.4. Proteaseinhibitoren

Zum Ansatz des Cocktails (PIC) wurden die folgenden Proteaseinhibitoren (Calbiochem) benötigt.

Inhibitor	Inaktiviert
Antipain	Kathepsin A und B
	Papain
	Trypsin
Chymostatin	Chymotrypsin
	Papain
	Cystein-Proteasen
Leupeptin	Plasmin
	Trypsin
	Papain
	Kathepsin B
Pepstatin A	Pepsin
	Kathepsin D

## 2.5. Antikörper

## 2.5.1. Primäre Antikörper

In der Immunfluoreszenz und im Western Blotting wurden die nachfolgend angeführten Antikörper benutzt.

Bezeichnung	Antigen	Ursprung	Herkunft	Verdünnung
AB3718 *	Synthetisches Peptid der N- terminalen Aminosäuren aa1-11 des Annexin VI- Proteins: MAKIAQGAMYR aus Rattus norwegicus (Grewal et al., 2000)	Schaf	Polyklonal	Immunfluoreszenz: 1:10 Immunoblotting: 1:250
1CO908	Annexin VI aus Ratten- Endosomen (Ortega et al., 1998)	Kaninchen	Polyklonal	Immunfluoreszenz: 1:10 Immunoblotting: 1:100
H 28	Annexin II: p36 Protein vom Schwein (Osborn et al., 1988)	Maus	Monoklonal	Immunfluoreszenz: 1:100 Immunoblotting: 1:1000
Anti R	LDL-Rezeptor aus der Ne- bennierenrinde vom Rind (Russel et al., 1984)	Kaninchen	Polyklonal	Immunfluoreszenz: 1:500 Immunoblotting: 1:500
A9521	Glucose-6-Phosphat-Dehy- drogenase (gewonnen aus Saccharomyces cerevisiae)	Kaninchen	Polyklonal	Immunoblotting: 1:100

\*Der Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) wurde durch Bindung seines spezifischen Antigenes an ein Thiopropylsepharose 6B Gel affinitätsgereinigt. Material

## 2.5.2. Sekundäre Antikörper

Für immunfluoreszenztechnische Darstellung der 1. Antikörper wurden eingesetzt:

Esel-anti-Schaf F(ab')2-Fragmente Cy2-konjugiert	(Verdünnung 1:250)	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Kaninchen F(ab')2-Fragmente Cy2-konjugiert	(Verdünnung 1:250)	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Maus F(ab')2-Fragmente Cy3-konjugiert	(Verdünnung 1:250)	Jackson Immuno Research
Esel-anti-Maus F(ab')2-Fragmente Cy2-konjugiert	(Verdünnung 1:250)	Jackson Immuno Research

Fluorochrom	Maximale Absorption	Maximale Emmission
Cy2 (Carbocyanin)	490 nm	508 nm
Cy3 (Indocarbocyanin)	550 nm	570 nm

Bei der Immunodetektion der verschiedenen Proteine im Western Blot wurden benutzt:

Ziege-anti-Kaninchen F(ab')2-Fragmente HRP-konjugiert	t (Verdünnung 1:1000)	Jackson Immuno Research
Kaninchen-anti-Schaf F(ab')2-Fragmente HRP-konjugiert	t (Verdünnung 1:1000)	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Maus F(ab')2-Fragmente HRP-konjugiert	(Verdünnung 1:5000)	Jackson Immuno Research

## 2.6. Radiochemikalien

<sup>125</sup>I-Iod in NaOH-Lösung (3,7 GBq/ml,100 mCi/ml)

#### 2.7. Färbereagenzien

Bromophenolblau (3',3'',5'',5''-Tetrabromophenolsulfonephtalein)	Sigma
Dapi (Bisbenzimid)	Bayer
Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyane)	Molecular Probes
Ethidiumbromid	Sigma
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Ponceau-S Lösung 0,2% in 3% TCA	Serva

#### 2.8. Sonstige Reagenzien

Fugene 6 Transfection Reagent

Boehringer Mannheim

Amersham Life Science

#### 2.9. Nukleinsäuren

Der Vektor pCMVhLDLR zur Expression des humanen LDL-Rezeptors wurde freundlicherweise von Dr. F. Schnieders (Universität Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. pCMV5-EX-AII zur Expression von humanem Annexin II (Thiel et al., 1992) war ein Geschenk von Dr. V. Gerke (Universität Münster, Deutschland).

pCMVSPORT-Bgal	Gibco-Brl
pGEMT-easy	Promega
pcDNA3.1+	Invitrogen

## 2.10. Restriktionsendonukleasen

Enzym	Schnittstelle	Einheiten / µl
AspI	G↓GTACC	10
BamHI	G↓GATCC	20
EcoRI	G↓AATTC	20
HindIII	A↓AGCTT	18
SacI	GAGCT↓C	8
XbaI	T↓CTAGA	11

#### 2.11. Oligonukleotide

Zur Konstruktion und Sequenzierung von Annexin VI exprimierenden Vektoren wurden in der PCR-Amplifikation die folgenden Oligonukleotide eingesetzt.

Name	Position (Ratten Annexin VI cDNA) Sequenz		
Anx1	+1 - 23	5'-ATGGCCAAAATAATAGCACAGGGTGC-3'	
Anx2	+1998 - 2019	5'-GTCTTCTCCACCACAGAGCGC-3'	
WT 3	+970 - 993	5'-GAAATGGCCAGCGGCATCATTGTC-3'	
Anx15	+1 - 21 / 44 - 53	5'-GCAAGCTTGCCGCCACC- ATGGCCAAAATAGCACAGGGT, ACGACTTCGC- Deletion	3′
Anx16	+1 - 53	5′-GCAAGCTTGCCGCCACC- Punktmut. ATGGCCAAAATAGCACAGGGTGGCATG <mark>GCC</mark> CGAG	GGC-3′
Τ7		5′-GGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATG- CTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT	T-3′
SP6		5'-GCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCAT GTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGA	`ATG- TT-3´

## 2.12. Enzyme

E. coli Klenow DNA-Polymerase I (2 u/µl)	Boehringer
T4 DNA-Ligase (1-3 u/µl)	Promega
Taq DNA-Polymerase (5 u/µl)	Pharmacia

#### 2.13. Geräte

Auto-Gamma Cobra 2 counter	Packard
Blotting-Kammer Trans cell blot	Bio-rad
French pressure cell press	SLM Aminco
Gelelektrophorese-Kammer	Höfer Scientific Instruments
Mechanischer Zelllysator Dstroy-SR	Biozym Diagnostik
Mikroskop Axiovert 100 mit Ph3 Plan-Apochromat 63er Objektiv	Zeiss
Netzanschlußgerät Frigostat	Desaga
Photometer Lambda 20	Perkin Elmer
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann

Zentrifuge Biofuge 13 Zentrifuge J2-HC Zentrifuge 5810 R

#### 2.14. Labormaterial

Chamber Slides Lab-Tek 8-well Cover slips 13mm Deckgläschen 20\*20mm Einmalspritzen 1ml Gel-Blotting-Papier GB 002 Injektions-Kanülen Sterican 27G Messküvetten halb-mikro 10\*10\*45 Objektträger 76\*26mm PD 10 Säule Protran Nitrocellulose Transfer Membran Röntgenfilm Biomax MR 18\*24cm Zählröhrchen 5ml PP test tube und Verschlüsse Zellschaber Zentrifugenröhrchen Heraeus Instruments Beckmann Eppendorf

Nunc Assistent Superior Braun Schleicher&Schüll Braun Greiner Labortechnik Menzel Pharmacia LKB Biotech Schleicher&Schüll Kodak Packard Costar Beckmann

## **3.METHODEN**

#### 3.1. Zellkulturarbeiten

#### 3.1.1. Zellkulturpflege

Adhärente CHO-Zellen wurden in 72 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Nährmedium der Zellen bestand aus F12 (HAM) Nutrient Mixture, 10 % fötalem Kälberserum, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Alle 3 Tage wurden die adhärenten Zellen passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 5 ml Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur für 2 bis 3 Minuten. Die Proteolyse wurde mit 10 ml Nährmedium gestoppt und die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:7 passagiert. Die Zellen wuchsen in 15 ml Medium.

#### 3.1.2. Ausplattieren von Zellen

Nach Inhibition der tryptischen Proteolyse wurden der Zellsuspension zwei Tropfen entnommen und in einer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Aus der Bestimmung der Zellen pro ml Suspension errechnete sich ein Aliquot, welches dann in 6-well- oder 12-well-Mehrfachkulturschalen überführt wurde. Dieses Aliquot wurde mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml (6-well-Mehrfachkulturschalen) bzw. 1,5 ml (12-well-Mehrfachkulturschalen) per well ergänzt.

#### 3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Trypsinierte Zellen wurden 5 Minuten lang bei 1.800 rpm in einer Eppendorf 5810 R abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Gefrierlösung (80 % F12 Vollmedium, 10 % DMSO und 10 % fötales Kälberserum) aufgenommen und in 1,8 ml Cryoröhrchen überführt. Auf eine zweistündige Kühlung bei 4 °C folgten eine mehrtägige Lagerung bei –80 °C und schließlich die Überführung der eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff.

Rekultiviert wurden die Zellen durch zweiminütiges Auftauen bei 37 °C, sofortiges Versetzen mit Nährmedium und anschließender Überführung in eine 72 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche. Die überlebenden Zellen erholten sich in 15 ml Medium, welches alle 1-2 Tage gewechselt wurde.

#### 3.2. Präparation von Plasmid DNA

Die Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Plasmide wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

#### 3.2.1. Herstellung von Annexin VI-Expressionsvektoren

Die Konstruktion des Annexin VI exprimierenden pcDNAanx6-Vektors erforderte die Amplifikation und Isolierung der kompletten Annexin VI cDNA aus einer Rattenleber Genom-Bibliothek (Uni-Zap XR) der Firma Stratagene. Das PCR-Fragment wurde in einen pGEMT-easy Vektor der Firma Promega subkloniert und mit Hilfe von T7- und SP6-Primern sequenziert. Ein HindIII-XbaI-Annexin VI Fragment wurde isoliert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ der Firma Invitrogen kloniert. Die Expression der Annexin VI cDNA stand unter der Kontrolle des viralen CMV-Promoters und wurde in RT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz überprüft.



#### Abb. 3.1.: PCR-Amplifikation der Annexin VI kodierenden Region

Durch PCR-Amplifikation mit Hilfe eines N-terminalen 5'-Annexin I- und eines reversen Annexin II-Primers wurde ein 2,2 kb Fragment gewonnen, welches die gesamte kodierende Region von Annexin VI aus Rattus norvegicus (Fan et al., 1995) enthielt.

#### 3.2.2. Konstruktion der Annexin VI-Mutanten

Die C-terminalen Deletionsmutanten  $\Delta 1$ -641 und  $\Delta 1$ -500 wurden durch Verdau der pcDNAanx6 mit den Restriktionsenzymen EcoRI/XbaI ( $\Delta 1$ -641) und BamHI/XbaI ( $\Delta 1$ -500) hergestellt. Nach Behandlung der 5'-Termini mit der Klenow E. coli DNA Polymerase I wurden die Deletionsmutanten mit Hilfe der Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Die 1,9 kb Annexin VI-HindIII/EcoRI- ( $\Delta 1$ -641) bzw. 1,5 kb HindIII/BamHI- ( $\Delta 1$ -500) Fragmente wurden nach Elution mit dem HindIII/XbaI geschnittenen pcDNA3.1+-Vektor religiert.

Zur Konstruktion der C-terminalen Deletion  $\Delta 1$ -352 wurde die partielle Annexin VI cDNA mit Hilfe des N-terminalen 5'-Annexin I-Primers und eines reversen WT3-Primers, entsprechend der Nukleotide + 970 - 993, in der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. An die Subklonierung in den pGEMT-Vektor und Kontrollsequenzierung schloß sich ein Restriktionsverdau mit SacI an. Nach dem Auffüllen der 5'überstehenden Enden mit dem Klenow-Fragment der E. coli Polymerase I wurde das mittels eines HindIII-Verdaus gewonnene 1 kb Annexin VI-HindIII-[SacI]-Fragment isoliert und in den HindIII/XbaI geschnittenen pcDNA3.1+-Vektor kloniert.

Die Deletion Δ1-175 erforderte den Verdau des pcDNAanx6-Vektors mit AspI und nach anschließender Behandlung mit der Klenow Polymerase I mit HindIII. Das 522 bp HindIII-[AspI]-Fragment wurde isoliert und in pcDNA3.1+ (HindIII/XbaI verdaut) kloniert.

Die N-terminale Deletionsmutante ∆aa8-15 entstand durch PCR-Amplifikation der Annexin VI cDNA mit einem Nterminalen 5'Oligonukleotid (Anx15), welches eine interne Deletion der Nukleotide von Position +22 – 42 aufwies. Nach Subklonierung in den beschriebenen pGEMT-Vektor und Sequenzierung wurde ein 1995 bp HindIII-XbaI-Fragment mit dem HindIII/XbaI verdauten pcDNA3.1+-Vektor religiert.

Zur Konstruktion der N-terminalen Punktmutation aaTyr→Ala wurde als 5'Primer der Polymerase-Ketten-Reaktion ein Oligonukleotid (Anx16-Primer) benutzt, welches als zehnte Aminosäure ein Alanin kodierte.

#### 3.2.3. Mini- und Maxi-Präparation (Birnboim u. Doly, 1979)

Aus transformierten und Ampicillin-resistenten Escherichia coli Über-Nacht-Kulturen wurde mittels Mini-, Midioder Maxipräparation Plasmid-DNA gewonnen.

Zur Minipräparation wurde eine Bakterienkolonie in 1,5 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) Luria Bertani-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l Aqua bidest, pH 7.0) überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden mit einer 1minütigen Zentrifugation bei 8.000 rpm pelletiert und in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA und 100 µg/ml RNAse A der Firma Qiagen) sorgfältig resuspendiert. Alkalische Zelllyse erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Puffer 2, bestehend aus 0,2 M NaOH, 1 % Natriumdodecylsulfat. Während einer 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen durch das Natriumdodecylsulfat solubilisiert, chromosomale und Plasmid-DNA durch die NaOH-Behandlung denaturiert. 200 µl 3 M Kaliumacetat (Puffer 3) neutralisierte das Lysat. Die erhöhte Salzkonzentration präzipitierte genomische DNA, Proteine und Zelltrümmer. Die kleinere, kovalent geschlossene Plasmid-DNA blieb in Lösung. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer Heraeus Biofuge 13 pelletiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Versetzen mit zweifachem Volumen abs. EtOH gefällt und 15 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Zur Entfernung präzipitierter Salze wurde das DNA-Pellet anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das nach erneuter Zentrifugation luftgetrocknete Pellet wurde in Aqua bidest aufgenommen. In der Regel wurden 5-20 µg Plasmid-DNA präpariert und bei –20 °C gelagert.

Nach Kontrolle der präparierten Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdaus wurden mit Hilfe einer sogenannten Maxi-Präparation (Qiagen) 0,8-2 mg der gewünschten DNA gewonnen. Eine 1 ml Bakterienkultur wurde dazu in 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Die Amplifikation erfolgte über 12-16 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler bei 120 rpm. Die Kultur erreichte eine Dichte von ungefähr  $1x10^9$  Zellen pro ml. Nach Behandlung der Proben mit jeweils 10 ml der beschriebenen Puffer 1, 2 und 3 wurde der DNA haltige Überstand in eine mit QBT-Puffer (750 M NaCl, 50 mM MOPS [3-N-morpholinopropansulfonsäure], 15 % Isopropanol und 0,15 % Triton X-100) equilibrierte Qiagen-tip-Säule gegeben. In der Säule befanden sich mit Diethylaminoethanol beschichtete Silikat-Partikel, die abhängig von pH-Wert und Salzkonzentration mit den Phosphatgruppen der Plasmid-DNA interagierten. Um restliche RNA und Proteine zu entfernen, wurde die Säule zweimal mit 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS und 15 % Isopropanol, pH 7.0) gewaschen. Die gebundene DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15 % Tris, pH 8.5) eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 bis 300  $\mu$ I Aqua bidest resuspendiert. Die anschließende OD-Bestimmung ermöglichte das Einstellen der DNA-Konzentration auf 1  $\mu g/\mu$ L.

#### 3.2.4. Kontrolle der präparierten DNA

Die Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung ihrer Qualität und Korrektheit mit Restriktionsenzymen (Pharmacia Biotech) verdaut. Hierbei wurde 1 µg DNA in 10 µl 10xOne-Phor-all plus Puffer (100 mM Magnesiumacetat, 100 mM Tris-acetat, 500 mM Kaliumacetat) verdünnt mit Endonucleasen versetzt. Der Puffer wurde ein- bis zweifach konzentriert eingesetzt. Eine Probe wurde mit 8-30 Einheiten von Restriktionsenzymen versetzt und mit 3-7 µl Aqua bidest auf 10 µl ergänzt. Die DNA wurde eine Stunde bei 37 °C verdaut und anschließend mit 1,5 µl Probenpuffer ( 0,05 % Bromophenolblau, 8,75 % Ficoll und 1xTBE aus 90 mM Tris-Borat und 2 mM EDTA) beschwert. Die DNA-Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lambda HindIII Größenmarkers (Pharmacia) identifiziert.

Zur Herstellung eines 1 % Geles wurde 1 g Agarose unter Erwärmen in 100 ml 1xTBE solubilisiert. Die Lösung wurde auf ungefähr 60 °C heruntergekühlt und mit fluoreszierendem Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,025 µg/ml versetzt. Die Agarose wurde anschließend in eine geeignete Vorrichtung gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTBE überschichtet. Die Taschen des Agarosegels wurden mit Probenmaterial beladen und die Fragmente in einem elektrischen Feld mit 60 V Spannung getrennt. Die Laufzeit der bei neutralem pH negativ geladenen DNA in Richtung Anode betrug 1,5-2 Stunden. Die Ethidiumbromid/DNA-Komplexe wurden unter UV-Bestrahlung visualisiert und photographisch dokumentiert.

#### 3.3. Transiente Gentransfektionen

Der transiente Gentransfer in CHO-Zellen erfolgte mit dem Fugene 6 Transfektionsreagenz, einer nicht-liposomalen Mischung aus Lipiden in 80 % Ethanol. 24 Stunden vor Durchführung des Transferexperimentes wurden jeweils 2x10<sup>5</sup> Zellen in 6-well-Schalen subkultiviert. Am Tag der Transfektion erreichten die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80 %. Das Reagenz wurde in F12 Nutrient Mixture überführt, wobei 100 µl F12 pro µg Plasmid-DNA verwendet wurden. Optimale Transfektionseffizienz und geringe Cytotoxizität wurde bei einem Verhältnis von µl Fugene zu µg Plasmid-DNA von 2:1 erreicht. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das verdünnte Transfektionsreagenz tröpfchenweise auf die Plasmid-DNA gegeben. Zur Bildung von Lipid/DNA-Komplexen wurden weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur benötigt. Die Mixtur wurde anschließend auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, wobei pro well 2 µg DNA eingesetzt wurden. Die Proteinexpression erfolgte über mindestens 16-24 Stunden bei 37 °C Inkubation der Zellen.

#### 3.4. Präparation von Proteinextrakten

24 Stunden nach Transfektion von 3-4x10<sup>5</sup> Zellen wurde das Medium entfernt und ein Waschschritt mit PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3) durchgeführt. Mit einem Schaber wurden die Zellen von dem Boden der Mehrfachkulturschalen in PBS gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 1.800 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge 5810 R wurde das gewonnene Zellpellet in 200 μl Solubilitätspuffer (1 % Triton X-100, 50 mM Tris, 2 mM CaCl<sub>2</sub> und 80 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert. Im Verhältnis 1:1000 wurde der Puffer mit Proteaseninhibitorcocktail (1 mM Pepstatin A, 10 mM Chymostatin, 10 mM Leupeptin und 10 mM Antipain) versetzt, welcher die Aktivität freigesetzter intrazellulärer Proteinasen minimierte. Nach 30minütiger Zelllyse bei Raumtemperatur wurden der Zelldebris 3 Minuten bei 13.000 rpm pelletiert und die Proteine dekantiert.

#### 3.5. Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Ein Aliquot von 10 µl des Extraktes wurde mit Aqua bidest auf ein Volumen von 400 µl ergänzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lowry-Lösung (65 Teile Lösung A [3 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0,15 N NaOH], ein Teil Lösung B [2 % Kaliumnatriumtartrat] und ein Teil Lösung C [1 % CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O]). Nach gründlichem Vortexen wurde die Probe 10 Minuten inkubiert und mit 125 µl Folinreagenz (1:1 mit Aqua bidest verdünnt) versetzt. Die Extinktion wurde nach einer 30minütigen Inkubation mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Rinderalbumin (2 mg/ml) diente zur Erstellung einer Eichgerade und ermöglichte die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

#### 3.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

#### 3.6.1. Vorbehandlung der Proben

Gleiche Proteinmengen der verschiedenen Proben wurden mit Aqua bidest auf 100 µl aufgefüllt. Das Probenmaterial wurde dann mit 5fach konzentriertem Puffer (0,1 M Tris-HCl [pH 6.8], 2 % SDS, 20 % Glycerol, 1 % 2-Mercaptoethanol und 0,1 % Bromophenolblau) reduziert und beschwert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteine 10 Minuten bei 92 °C denaturiert und an das SDS gebunden, anschließend bei 4 °C gekühlt und abzentrifugiert. Als Größenmarker dienten ein biotinylierter Protein Marker (Biolabs) im Bereich von 6,5 kD bis 165 kD und der Rainbow Marker RPN 756 (Amersham) von 14,3 kD bis 220 kD. Als positive Kontrolle des Immunoblots wurde bovines Leber-Annexin VI (Biodesign International) eingesetzt.

#### 3.6.2. Gelelektrophorese (Laemmli et al., 1970)

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein diskontinuierliches Gelsystem aus Trenn- und Sammelgel benutzt. Der 30 ml Ansatz eines 10 % Trenngels beinhaltete 10 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %/ 0,8 %), 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 11,8 ml Aqua bidest, 0,6 ml 10 % SDS und 0,2 ml 10 % AP. Dem Ansatz wurden 10 µl TEMED hinzugefügt, welches mit dem AP als Katalysator der Polymerisation diente. Das Trenngel wurde mit Isobutanol überschichtet, um eine Sauerstoffbedingte Inhibition der Polymerisation zu vermeiden. Nach Aushärtung des Geles und Entfernung des Isobutanols wurde mehrmals mit Aqua bidest und abschließend mit Obergelpuffer gewaschen.

Das 3,5 % Sammelgel wurde in einem Volumen von 20 ml angesetzt aus 2,4 ml Acrylamid-Bisacrylamid (30 %/ 0,8 %), 5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 12,1 ml Aqua bidest, 0,2 ml 10 % SDS und 0,3 ml 10 % AP. Nach Zugabe von TEMED wurde der Ansatz auf die Oberkante des polymerisierten Trenngels gegossen und anschließend der Gelkamm eingeführt. Dem Entfernen des Kammes aus dem ausgehärteten Sammelgel folgte das Spülen der Kammern mit Laufpuffer. Dieser Puffer diente als Elektrodenlösung und bestand aus 0,25 M Tris, 0,2 M Glycin und 1 % SDS (pH 8.8). Nach dem Laden der Kammern mit dem Probenmaterial erfolgte der Einlauf der Proteine in das Sammelgel bei einer Stromstärke von 5 mA (6 x 8 cm Gel) bzw. 20 mA (10 x 13 cm Gel). Nach Erreichen des Trenngels benötigte das Auftrennen der Proben eine 3-4stündige Stromzufuhr von 10 bzw. 40 mA.

#### 3.6.3. Western blotting (Towbin et al., 1979)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in Schleicher&Schüll Protran Nitrocellulose-Membran, 4 Blatt Blottingpapier und 2 Polstern eingebettet. Die Migration der Proteine auf die Membran vollzog sich in einer mit Blottingpuffer gefüllten Trans-blot-cell-Kammer der Firma Bio-rad. Der Blottingpuffer setzte sich zusammen aus 3 % Borsäure und 20 % Methanol (pH 9.0). Der Transfer erfolgte über mindestens 6 Stunden bei einer Stromstärke von 250 mA. Zur Überprüfung des Transfers und der Intaktheit der Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran anschließend 10 Minuten lang in Ponceau S-Lösung gebadet. Mehrmaliges Waschen mit Aqua bidest und PBS führte zur Entfärbung der Proteinbanden.

#### 3.6.4. ECL Immunodetektion (Whitehead et al., 1979)

Zum Nachweis spezifischer Antigene mit Hilfe eines Immunoblots wurden auf der Nitrocellulose befindliche Proteine 1 Stunde lang mit Blocklösung (0,1 % Tween, 10 % Milchpulver in PBS) behandelt. Somit wurde eine unspezifische Antikörperbindung minimiert. Bei Raumtemperatur erfolgte anschließend die eineinhalbstündige Inkubation der Membran mit dem 1. Antikörper (empirisch verdünnt in 0,1 % Tween, 5 % BSA in PBS). Die eingesetzten Antikörperverdünnungen sind im Materialteil 2.5. tabellarisch dargestellt. Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten) mit PBS, 0,1 % Tween wurde anschließend zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung 45 Minuten bei Raumtemperatur mit dem 2. Anti-IgG-Antikörper inkubiert. Dieser war kovalent an Meerrettich-Peroxidase gebunden und wurde mit Block-Lösung (siehe oben) verdünnt. Unspezifische Antikörperbindungen wurden mit jeweils drei 5minütigen Waschschritten mit PBS, 0,3 % Tween und PBS, 0,1 % Tween bei Raumtemperatur vom Nitrocellulose Filter abgewaschen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper 1-Antikörper 2-Komplexe wurde die ECL Chemolumineszenz-Reaktion benutzt. Die an den zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidierte Luminol in der Gegenwart von Phenol, was zu maximaler Lichtemission bei 428 nm Wellenlänge führte. Es resultierte eine Schwärzung des Röntgenfilms (Biomax, Kodak). Die Substrat- und Zeitabhängige Chemolumineszenzreaktion erreichte nach 5 bis 20 Minuten ihren Höhepunkt.

#### 3.7. Präparation humaner Lipoproteine (Havel et al., 1953)

Nach erfolgter Abnahme von 2000 ml Blut nichthyperlipämischer Spender wurden die Proben mit 500 µl Benzamidine versetzt und bei Raumtemperatur 45 Minuten in einem Glasröhrchen geronnen. Das Serum wurde über 30 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl in einer Heraeus-Christ-Laborzentrifuge abzentrifugiert. 1000 ml Serum wurden anschließend mit 5 ml einer 4 % EDTA-Lösung (pH 7.4) versetzt, um Kalzium-abhängige Proteasen zu inhibieren. Zur Gewährleistung der Sterilität wurden je 5 ml einer 2 % Gentamycin-Sulfat-Lösung und einer 4 % Natriumazid-Lösung (pH 7.4) ergänzt. Die Präparation des LDL vollzog sich in drei aufeinanderfolgenden Ultrazentrifugationen bei 4 °C im Kaliumbromid-Gradienten. Die Eigendichte des Serums von 1,006 g/ml wurde durch Zugabe von 27,75 g Kaliumbromid pro 1000 ml auf 1,025 g/ml erhöht. Die Proben wurden in Quick-seal-Röhrchen überführt und in einem 60 Ti-Rotor 20 Stunden bei 38.000 rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand samt VLDL und IDL wurde verworfen und die Bodenfraktion, bestehend aus LDL und HDL, auf Eis gelagert. Die Dichte wurde von 1,025 g/ml auf 1,050 g/ml heraufgesetzt (36,932 g KBr pro 1000 ml Serum). Eine weitere Zentrifugation trennte bei 38.000 rpm über 20 Stunden das HDL von einem Low Density Lipoprotein-reichen Überstand. Zur weiteren Aufreinigung wurde die LDL-Fraktion mit einer Dichte von 1,050 g/ml nochmals 20 Stunden bei 38.000 rpm zentrifugiert. Das LDL wurde in KBr-Lösung bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch gründlich gegen PBS dialysiert.

#### 3.8. Radioaktives Markieren von LDL mit <sup>125</sup>I-Iod (McFarlane, 1958)

Präpariertes LDL wurde mit Hilfe der Iodmonochlorid-Methode markiert. Dabei wurde 1 ml LDL (5 mg/ml) mit 800  $\mu$ l 1 M Glycin-Lösung (pH 10.0) versetzt. Anschließend wurden 6  $\mu$ l einer <sup>125</sup>I-Stocklösung (1  $\mu$ l = 3,7 MBq) in 200  $\mu$ l Glycin-Lösung gegeben und diese der LDL-Glycin-Mixtur zugesetzt. Nach Beimischung von 40  $\mu$ l Iodmonochloridrid-Lösung (0,1 % Iodmonochlorid in 10 ml 0,1 M HCl, 2 M NaCl über 90 ml Chloroform) wurde der Ansatz 3 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde bei 4 °C lichtgeschützt gelagert und aufgrund der Phasenbildung vor Gebrauch geschüttelt. 2 ml markiertes LDL wurden auf eine mit PBS equilibrierte PD 10-Säule der Firma Pharmacia gegeben. Nach Hinzufügen von 1 ml PBS wurde das Eluat verworfen. Die Addition weiterer 2 ml PBS lieferte 2 ml gereinigtes <sup>125</sup>I-LDL. Zur Entfernung restlicher freier Radioaktivität durchlief dieses Volumen nochmals wie beschrieben eine PD 10-Säule. In vier unterschiedlichen Präparationen wurde <sup>125</sup>I-LDL mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml und einer spezifischen Radioaktivität von 180-300 cpm/ng gewonnen. 93-97 % des iodierten LDL waren mit Trichloressigsäure präzipitierbar.

## 3.9. Radioaktive Experimente

#### 3.9.1. <sup>125</sup>I-LDL Aufnahme

Zur Untersuchung der <sup>125</sup>I-LDL Internalisation wurden 3x10<sup>5</sup> CHO-Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit PBS gewaschen. Zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen schloß sich eine 30minütige Präinkubation bei 37 °C mit 1 % BSA in F12-Medium an. Auf Eis folgte die Zugabe von 1x10<sup>6</sup> cpm <sup>125</sup>I-LDL pro 3x10<sup>5</sup> Zellen. Der markierte Ligand befand sich in einem Inkubationsmedium aus 1 % BSA in F12. Die Internalisation wurde in einem doppelten Versuchsansatz studiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Aufnahme wurde ein dritter Ansatz mit 50fachem Überschuß an nicht radiomarkiertem LDL versetzt. Die Internalisierung des Liganden erfolgte während einer Inkubation bei 37 °C über 60 Minuten bzw. 6 Stunden. Die Zellen wurden hinterher auf Eis dreimal mit kaltem PBS und abschließend 5 Minuten mit Heparin in PBS (20 Einheiten/ml) gewaschen. Somit wurde freies und oberflächengebundenes <sup>125</sup>I-LDL entfernt und eine weitere Aufnahme verhindert. Nach 30minütiger Zelllyse bei Raumtemperatur mit 1 ml 0,1 N NaOH wurden die Proben in 5 ml Zählröhrchen der Firma Packard überführt. Die Zellassoziierte Radioaktivität wurde in einem Packard Gamma Cobra 2 counter ermittelt. Die Werte wurden entsprechend ihrer Zellproteinkonzentration korrigiert, welche anhand eines 100 µl Aliquots des Lysates nach Lowry bestimmt wurde.

Zur Bestimmung von <sup>125</sup>I-LDL Aufnahmekinetiken wurden für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt 1x10<sup>5</sup> CHO-Zellen in 12-Loch-Schalen subkultiviert. Nach der bereits beschriebenen Präinkubation mit 1 % BSA in F12-Medium wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis gekühlt, um die endocytotische Stoffwechselaktivität zu minimieren. Es folgte eine 30minütige Bindung des Liganden am Rezeptor bei 4 °C. Das freie <sup>125</sup>I-LDL wurde mit zwei 5minütigen PBS-Waschschritten entfernt und nach Zugabe von 1 % BSA in F12-Medium der Ligand bei 37 °C internalisiert. Die zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten aufgenommene Radioaktivität wurde wie beschrieben bestimmt.

#### 3.9.2. Radioaktive Degradationsexperimente

Zur Bestimmung der degradierten Apolipoproteine des LDL wurden nach 6stündiger Inkubation von 3x10<sup>5</sup> Zellen bei 37 °C mit <sup>125</sup>I-LDL 100 µl des Mediums abgenommen und zusammen mit 100 µl 2 % BSA in 1 ml eiskalte 3 M Trichloressigsäure überführt. Nach intensivem Vortexen fielen die Proteine während einer 10minütigen Lagerung bei 4 °C aus. Noch freies <sup>125</sup>I wurde mit 250 µl einer 0,7 M Silbernitratlösung gebunden und mitsamt der gefällten Proteine 5 Minuten in einer Heraeus-Zentrifuge bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde die Radioaktivität des abgenommenen Überstandes bestimmt.

In einigen Experimenten wurde zur Bestimmung des abgebauten <sup>125</sup>I-LDL 500 µl Medium in 150 µl 50 % Trichloressigsäure und 75 µl 10 % Triton X-100 überführt. Nach 10minütiger Lagerung auf Eis wurden die gefällten Proteine 5 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Zur Entfernung des freien Jods wurden dem Überstand 20 µl einer 40 % Kaliumjodidlösung beigemengt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol) wurden ergänzt und nach erneuter 2minütiger Inkubation 1 ml Chloroform hinzugefügt. Während weiterer 5 Minuten bei Raumtemperatur extrahierte das Chloroform degradiertes <sup>125</sup>I-LDL in die wässerige Oberphase. Diese wurde vollständig abgenommen und ihre Radioaktivität bestimmt.

Die Degradationsdaten wurden anhand der Proteinkonzentrationen der Zelllysate korrigiert.

#### 3.10. Immunfluoreszenz

#### 3.10.1. Beschichten von Cover Slip-Deckgläsern mit Poly-L-Lysin (Goslin u. Banker, 1991)

Für immunfluoreszensische Untersuchungen wurden CHO-Zellen auf vorbehandelten Cover Slip-Deckgläschen (Assistent) ausplattiert. Zum Beschichten der Cover Slips wurden die Deckgläser zweimal 10 Minuten mit Aqua bidest gewaschen, ehe sie 18-36 Stunden in 65 % Salpetersäure badeten. Es folgten jeweils zwei einstündige und 30minütige Waschungen mit Aqua bidest. Nach Lufttrocknung bei 37 °C wurden die Deckgläschen 45 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Anschließend wurde jedes Cover Slip zur Verstärkung der Zelladhäsion mit 200 µl 0,1 % Poly-L-Lysin (MW 30.000-70.000) in 100 mM Boratpuffer (pH 8.5) überzogen. Die beschichteten Deckgläser wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Alternativ wurden die Deckgläschen 5 Minuten mit 2 % 3-aminopropyltriethoxy Silane in Aceton beschichtet. Nach einem 5minütigem Bad in reinem Aceton wurden die Cover Slips zweimal 5 Minuten mit Aqua bidest gewaschen. Die anschließend luftgetrockneten Deckgläser wurden mindestens 4 Stunden unter UV-Bestrahlung sterilisiert. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurden die beschichteten Deckgläser mit PBS gewaschen.

#### 3.10.2. Durchführung der Immunfluoreszenz

7,5x10<sup>4</sup> CHO-Zellen wuchsen auf einem Deckgläschen in einer 12-Loch-Mehrfachkulturschale. 24 Stunden nach Transfektion mit 1 µg Plasmid-DNA erreichten die Zellen eine Konfluenz von annähernd 50 %. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd, 2 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Um Rückstände der Fixationslösung zu entfernen, wurde anschließend viermal mit PBS gewaschen. Darauf folgte ein 5minütiger Waschschritt mit 0,5 % Glycin, 0,05 % Saponin in PBS. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 0,5 % Glycin, 0,05 % Saponin, 1 % BSA, 10 % Eselserum in PBS inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in der gewünschten Verdünnung in Blocklösung eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.). Die Bindung an die Epitope des Antigens vollzog sich während einer Inkubation über 60 Minuten bei 37 °C. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen 5 Minuten mit 0,5 % Glycin, 0,05 % Saponin in PBS gewaschen. Durch Zugabe eines Fluorochrom-markierten sekundären Antikörpers wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion indirekt detektiert. Dafür wurden die Zellen 45 Minuten bei 37 °C mit dem in Blocklösung verdünnten zweiten Antikörper inkubiert. Nach vier PBS-Waschungen über jeweils 5 Minuten wurden die Zellkerne 3 Minuten lang mit 0,001 % Dapi (Bisbenzimid) in PBS gefärbt. Die Zellen wurden nochmals dreimal mit PBS gewaschen, ehe die Cover Slips mit jeweils 5 µl Mowiol-Kunstharz auf einem Objekträger eingedeckelt wurden. Als Ausbleichschutz wurde dem Mowiol im Verhältnis 1:5 1 % PPD (2,5 Diphenyl-1,3,4-oxadiazole) in PBS beigemischt. Die Deckgläser wurden anschließend luftdicht mit Nagellack umschlossen.

Die Fluoreszenzen wurden veranschaulicht und dokumentiert mit einem konfokalen Leitz DMIRBE Argon-Krypton-Laser Mikroskop und einem Zeiss Axiovert 100 Mikroskop (Ph3 Plan-Apochromat 63er Objektiv).

#### 3.10.3. DiI-LDL-Aufnahme von CHO-Zellen

1 ml LDL (2 mg/ml) wurde in einer mit PBS equilibrierten PD 10-Säule der Firma Pharmacia von Kaliumbromid gereinigt. Nach dem Einlaufen des Volumens wurden 1,8 ml PBS hinzugefügt und das Eluat verworfen. Eine weitere Zugabe von 2,2 ml PBS ermöglichte das Sammeln von 1 ml Lipoproteinlösung. Der Proteingehalt wurde nach Lowry bestimmt und die Konzentration mit PBS auf 2 mg LDL/ml eingestellt. Zur Markierung der Lipoproteine wurde das fluoreszierende Phospholipidäquivalent DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyane) gewählt. 1 ml LDL wurde mit 100 μl 0,3 % DiI in DMSO (Dimethylsulfoxid) lichtgeschützt bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur

Entfernung von nicht in das LDL inkorporiertem DiI mußte der Ansatz nochmals eine equilibrierte PD 10-Säule durchlaufen. Das gewonnene Eluat wurde lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Um die Aufnahme von DiI-LDL in der Immunfluoreszenz zu studieren, wurden auf einem Deckgläschen in einer 12-Loch-Schale 7,5x10<sup>4</sup> Zellen kultiviert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Minimierung der unspezifischen Bindung von LDL an die Zelloberfläche wurden die Zellen 30 Minuten bei 37 °C mit 1 % BSA in F12-Medium inkubiert. Nach 20minütiger Vorkühlung erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 Minuten mit 5  $\mu$ g/ml DiI-LDL bei 4 °C. Zwecks Entfernung freier Liganden wurde dreimal mit F12-Medium gewaschen. Das DiI-LDL wurde 5 Minuten bei 37 °C internalisiert. Jeweils zwei Waschgänge mit PBS (5 Minuten) und 2 % BSA in PBS (10 Minuten) schlossen sich an. Zwei 5minütige Waschschritte mit Heparin in PBS (20 Einheiten/ml) entfernten das restliche oberflächengebundene DiI-LDL. Die Zellen wurden wie beschrieben fixiert und weiterbehandelt, nachdem sie nochmals zweimal mit PBS gewaschen wurden.

#### 3.11. Membranpräparationen

1x10<sup>6</sup> CHO-Zellen wurden in einer Ø10 cm Petrischale (Nunc) subkultiviert und mit 10 μg Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Schaber gelöst und in 2 ml PBS aufgenommen. Nach einer 5minütigen Zentrifugation in einer Heraeus Biofuge bei 7.500 rpm wurde das gewonnene Zellpellet in 2 ml French-Press-Puffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Um vorzeitige Proteindegradation zu vermeiden, wurde sämtlichen Pufferansätzen im Verhältnis 1:1000 der in Kapitel 3.4. beschriebene Proteaseninhibitorcocktail beigemischt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Dstroy-SR der Firma Biozym mechanisch aufgeschlossen. Eine 15minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm lieferte einen cytosolischen Überstand und ein membranös angereichertes Pellet. Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung 1 Stunde bei 100.000 rpm in einer TL-100 der Firma Beckmann ultrazentrifugiert. Die mit Membranfraktionen und Zellorganellen angereicherten Pellets wurden zusammen in 2,5 ml French-Press-Puffer aufgenommen und nochmals mechanisch lysiert. Dabei wurde das Probenmaterial in der French pressure cell einem Druck von 180.000 Kilopascal ausgesetzt. Nach einer 1stündigen Ultrazentrifugation bei 100.000 rpm wurde das membranöse Pellet in 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 10 mM Tris aufgenommen und bei 52 °C in Lösung gebracht.

Die Konzentration des mit Membranfraktionen angereicherten Pellets und des aufgereinigten cytosolischen Überstandes wurde nach Lowry bestimmt und die Proben in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Zur Überprüfung der Qualität des Cytosols diente der Nachweis der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Es handelte sich hierbei um ein cytosolisches Enzym des Pentosephosphatweges, welches die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglucono-δ-lacton katalysierte.

Zur Studie Kalzium-abhängiger Membranbindung von Annexin VI wurden die mit Membranfraktionen angereicherten Proben Annexin VI überexprimierender Zellen mit EGTA (Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat ) behandelt. EGTA-haltige Lösungen unterschiedlicher Molaritäten wurden in 1 % Triton X-100, 50 mM Tris und 80 mM NaCl angesetzt. Die Membrananteile wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur mit der EGTA-Lösung inkubiert und anschließend bei einer 60minütigen Ultrazentrifugation bei 100.000 rpm erneut pelletiert. Die Membranfraktionen wurden in 1 % Triton X-100, 50 mM Tris, 80 mM NaCl resuspendiert und zusammen mit dem Überstand nach erneuter Proteinbestimmung in der Gelelektrophorese analysiert.

#### 3.12. Sucrosegradient

Um die intrazelluläre Verteilung des Annexin VI zu untersuchen, wurden insgesamt  $6x10^6$  CHO-Zellen in  $\emptyset$ 10 cm Nunc Petrischalen ausplattiert. 24 Stunden nach Transfektion mit Annexin VI Plasmid-DNA wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Schaber geerntet. Der Aufnahme in PBS folgte eine 5minütige Zentrifugation bei 2.500 rpm in einer Eppendorf 5810 R. Das Zellpellet wurde in 8 % Sucrose, 10 mM Tris (pH 7.4) resuspendiert und im Verhältnis 1:1000 mit Proteaseninhibitoren versetzt. Die Zellen wurden mittels zahlreicher Passagen durch eine Sterican 27G Injektions-Kanüle der Firma Braun endgültig aufgebrochen. Der Aufschluß der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Der Überstand einer anschließenden 10minütigen Zentrifugation bei 3.000 rpm wurde mit einfachem Volumen 2,5 M Sucrose, 10 mM Tris versetzt. 700  $\mu$ l dieser Probe wurden in ein Beckmann Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Schichtweise wurden jeweils 250  $\mu$ l einer 38 %-, 32 %-, 26 %-, 20 %-, 14 %- und 8 %-Sucroselösung auf das Probenmaterial gelegt. Während einer 18stündigen 4 °C Ultrazentrifugation bei 38.000 rpm in einer Beckmann TL-100 wurden die zellulären Fraktionen im Sucrose-Gradienten getrennt. Vom oberen Meniskus wurde das Probenmaterial anschließend in 150  $\mu$ l Aliquots entnommen und im SDS-PAGE analysiert.

## 4. ERGEBNISSE

## 4.1. Experimentelle Strategie der Analyse von Annexin VI

Die meisten Erkenntnisse über das Annexin VI in der Endocytose basieren auf Studien isolierter Membranfraktionen, biochemischer Charakterisierung subzellulärer Kompartimente und zellfreien Membranfusionsexperimenten. In der vorliegenden Arbeit soll ein Einblick in die mögliche Rolle des Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Aufnahme und Verstoffwechselung von Lipoproteinen gewonnen werden. Hierzu wird der Einfluß der Annexin VI-Überexpression auf endocytotische Mechanismen in CHO-Zellen untersucht. Diese Zelllinie besitzt lediglich geringe Mengen an endogenem Annexin VI, was die Analyse spezifischer Überexpressionseffekte und die Studie von Annexin VI-Mutanten erleichtert. Die experimentelle Charakterisierung von Annexin VI-Mutanten soll Eigenschaften, Lokalisation und funktionelles Verhalten umfassend beschreiben und molekularbiologisch zuordnen. In Abb. 4.1. werden der Annexin VI Wildtyp und die Konstruktion der Mutanten schematisch dargestellt.

Die CHO-Zellen werden mit Ratten Annexin VI Plasmid DNA transient transfiziert. Annexin VI ist ein endosomales Protein in Ratten-Hepatocyten (Jäckle et al., 1994). Die aus einer Genombibliothek isolierte Annexin VI cDNA entspricht der Annexin VI Sequenz aus Rattus Norvegicus (Fan et al., 1995). Ausgenommen sind hierbei Position +1110 (G $\rightarrow$ A, Ala $\rightarrow$ Gly) und +1187 (C $\rightarrow$ T, Ala $\rightarrow$ Val).

Aus dem Bestreben, den Bindungsmechanismus des Annexin VI an Membranen zu studieren und essentielle Strukturen des Proteines näher zu definieren, entstand die Idee der sukzessiven C-terminalen Deletion der Domänen. Hiermit verbunden ist die Untersuchung auf eventuelle Beeinflussung biochemischer Eigenschaften wie Kalziumbindung, Membranassoziation, intrazelluläre Verteilung und endocytotisches Verhalten. Diesbezüglich bedeutende Proteindomänen sollen identifiziert werden. Die Rolle des variablen N-Terminus von Annexin VI wird mit Hilfe einer Deletion der N-terminalen Aminosäuren 8-15 studiert. Der Einfluss der potentiellen N-terminalen Phosphorylierungsstelle aa10 Tyrosin wird durch Analyse der Punktmutation aaTyr→Ala hinterfragt. Dem Nachweis der Expression der Konstrukte in CHO-Zellen mittels Western Blot und Immunfluoreszenz schließen sich eingehende Analysen der kontrovers diskutierten intrazellulären Lokalisation des Annexin VI an. Hierbei werden das phänotypische Erscheinungsbild in der Immunfluoreszenz, Vergleiche mit detailliert studierten Proteinen und andere biochemische Charakterisierungen hinzugezogen. Weitere Aussagen bezüglich Bindungseigenschaften und intrazellulärer Verteilung sollen durch zusätzliche Analysen der Mutanten in komparativer Anlehnung an den Annexin VI Wildtyp ermöglicht werden. Studien des Einflusses von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Aufnahme und Verstoffwechselung von Lipoproteinen sollen bereits vorhandene Ergebnisse (Grewal et al., 2000) bestätigen und mit dem endocytotischen Verhalten der Mutanten verglichen werden. Dieses soll eine Zuordnung funktioneller Phänomene zu definierten Regionen der Molekularstruktur des Annexin VI erleichtern.



#### Abb. 4.1.: Schematische Darstellung des Annexin VI Wildtyps und der Konstruktion der Annexin VI-Mutanten

Die Herstellung des pcDNAanx6-Vektors erfolgte durch PCR-Amplifikation von Ratten Annexin VI cDNA mit einem 5'Anx I- und einem Anx II-Primer. Die isolierte DNA wurde in einen pGEMT-Vektor subkloniert und ein HindIII-XbaI-Annexin VI Fragment mit einem HindIII/XbaI geschnittenen pcDNA3.1+ Vektor ligiert. Die Konstruktion der Annexin VI-Mutanten ist in Kapitel 3.2.2. beschrieben. Die Deletionen der konstanten Region und der damit verbundene sukzessive Domänenverlust sind schematisch dargestellt: Die Mutante  $\Delta 1$ -641 entbehrt lediglich eine halbe Domäne.  $\Delta 1$ -500 weist eine Deletion von etwas über zwei,  $\Delta 1$ -352 von vier Domänen auf.  $\Delta 1$ -175 besitzt lediglich noch zwei Phospholipid- bzw. Kalziumbindungsstellen. Der variable N-Terminus ist dunkel hervorgehoben. Die N-terminale Deletion  $\Delta aa8$ -15 vermißt sieben interne Aminosäuren ( $\vee$ ). Bei einer Punktmutation (X) der zehnten Aminosäure des N-Terminus wird Tyrosin durch Alanin ersetzt. Die geschätzte Proteinmasse der Mutanten ist angegeben.

## 4.2. Nachweis von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in CHO-Zellen

## 4.2.1. Expression von Annexin VI

Voraussetzung der experimentellen Analyse ist die zuverlässige Überexpression von Annexin VI in CHO-Zellen. Deshalb sind zunächst die Transfektionsbedingungen in diesem experimentellen System etabliert und die Transfektionseffizienz kontrolliert sowie optimiert worden. Hierzu sind 0,5 , 1 , 2  $\mu$ g DNA mit jeweils 2 und 4  $\mu$ l Fugene Transfektionsreagenz komplexiert und auf 2x10<sup>5</sup> CHO-Zellen gegeben worden. Die Transfektionseffizienz ist mittels Immunfluoreszenz überprüft worden. Die Auswertung bestätigt ein vom Hersteller angegebenes Verhältnis von 2  $\mu$ l Fugene zu 1  $\mu$ g Plasmid-DNA als Optimum. In CHO-Zellen führt dieses zu einer Transfektionsrate von 10-30 %.

Zum Nachweis der Expression von Annexin VI werden aus transient transfizierten Zellen Proteinextrakte präpariert und gleiche Proteinmengen mit Hilfe der SDS-PAGE Gelelektrophorese untersucht. Abb. 4.2. zeigt einen representativen Western Blot, der die Überexpression von 68 kD Ratten Annexin VI in pcDNAanx6 transfizierten CHO-Zellen belegt.



Abb. 4.2.: Western Blot-Analyse Annexin VI überexprimierender CHO-Zellen

2x10<sup>5</sup> CHO-Zellen wurden mit Annexin VI Plasmid-DNA transfiziert und 24 Stunden später einer Proteinextraktpräparation unterzogen. 50 μg Zellprotein wurden im 10 % SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Das 68 kD-Protein wurde mit Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen Anti-Schaf-Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden empirisch verdünnt eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.). Die Proteinexpression wurde mit dem ECL-System detektiert. Dem biotinylierten Proteinmarker entsprechend sind Molekulargewichtsmarkierungen (kD) eingezeichnet.

Die Detektion ist sowohl mit dem polyklonalen Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718), als auch mit dem polyklonalen Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) durchführbar. Als positive Kontrolle dient 1 μg gereinigtes Rinder Annexin VI, welches ebenfalls mit beiden Antikörpern reagiert. Endogenes Annexin VI ist in β-Galaktosidase transfizierten CHO-Zellen aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus nach 2minütiger Exposition nicht erkennbar.

Ergebnisse

## 4.2.2. Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor

Zur Studie der Rolle des Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Aufnahme und Verstoffwechselung von Lipoproteinen werden Zellen mit LDL-Rezeptor Plasmid-DNA transfiziert. Neben dem Nachweis der erfolgreichen Expression des LDL-Rezeptors soll untersucht werden, ob diese durch die Transfektion mit Annexin VI pcDNA beeinflußt wird. Dazu wird der LDL-Rezeptor mit Annexin VI in CHO-Zellen coexprimiert. Extrakte transfizierter Zellen werden mit gleicher Proteinmenge im 10 % SDS-PAGE analysiert. Der in Abb. 4.3. dargestellte representative Western Blot vergleicht die LDL-Rezeptor-Expression in Annexin VI und LDL-Rezeptor cotransfizierten Zellen mit ausschließlich LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen.



Abb. 4.3.: Western Blot-Analyse der Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor in transfizierten CHO-Zellen Proteinextrakte aus jeweils  $2x10^5$  CHO-Zellen wurden nach Transfektion mit rekombinanten Plasmiden von LDL-Rezeptor und ß-Galaktosidase (LDL-R), Annexin VI und LDL-Rezeptor (Anx6+LDL-R), Annexin VI und ß-Galaktosidase (Anx6), ß-Galaktosidase (ß-Gal) präpariert. 20 µg Protein wurden in einer 10 % SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran wurde mit Kaninchen Anti-LDL-R-Antikörper inkubiert. Peroxidase-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper diente als sekundärer Antikörper. Die Detektion der LDL-Rezeptor-Expression mit Hilfe des ECL-Systems ist markiert ( $\rightarrow$ ). Das entsprechende Molekulargewicht ist angegeben.

Bei gleicher eingesetzter DNA-Menge differiert das Expressionsniveau des LDL-Rezeptors nicht. Die Expression von endogenem LDL-Rezeptor wird mit Hilfe ß-Galaktosidase transfizierter Zellen kontrolliert. Diese wird durch die Transfektion mit Annexin VI Plasmid-DNA nicht sichtbar beeinflußt. Potentielle Effekte in der funktionellen Analyse von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen können somit nicht auf ein verändertes Expressionsniveau des LDL-Rezeptors nach Cotransfektion mit pcDNAanx6 zurückgeführt werden.

# 4.2.3. Expressionsnachweis von C- und N-terminalen Deletionsmutanten mit verschiedenen Annexin VI-Antikörpern

Grundlage des experimentellen Arbeitens mit den konstruierten Annexin VI-Mutanten ist zunächst der Nachweis der erfolgreichen Transfektion und Expression in CHO-Zellen. Dazu werden Proteinextrakte transfizierter Zellen in der SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blotting analysiert. Hierbei wird außerdem die Detektierbarkeit der Konstrukte mit dem polyklonalen Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und dem polyklonalen Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) überprüft (siehe Kapitel 2.5.).



#### Abb. 4.4.: Western Blot-Analyse der Expression von Annexin VI-Mutanten in CHO-Zellen

A: 50 µg Protein aus 2x10<sup>5</sup> transfizierten CHO-Zellen wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit dem primären Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) und dem sekundären Peroxidase-konjugiertem Kaninchen Anti-Schaf-Antikörper inkubiert.

B: Eine 15 % SDS-Gelelektrophorese separierte 50 µg Protein. Zur Western Blot-Analyse wurde zuerst mit Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908), anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente 1 µg bovines Annexin VI.

C: Die N-terminale Deletionsmutante ∆aa8-15 reagiert im Gegensatz zum Annexin VI Wildtyp nicht mit primärem Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718). Zuvor wurden die Proteinextrakte in einem 15 % Polyacrylamidgel getrennt.

Die Proteinexpression wurde stets mittels ECL-System detektiert. Die Molekulargewicht-Markierungen sind dargestellt. Die eingesetzten Antikörperverdünnungen sind in Kapitel 2.5. aufgeführt.

Der in Abb. 4.4.A wiedergegebene representative Western Blot eines 10 % Polyacrylamidgeles belegt die Expression des 68 kD Ratten Annexin VI. Aufgrund der geringen Divergenz der Proteinmassen ist die kurze C-terminale Deletion  $\Delta$ 1-641 (66 kD) auf der Nitrocellulose-Membran etwa in Höhe des Annexin VI Wildtyps (68 kD) zu erkennen. Die Deletion  $\Delta$ 1-500 (51 kD) wird zwischen der 46,5 kD und 57 kD Markierung detektiert. Das Expressionsniveau von endogenem Annexin VI wird mit Hilfe ß-Galaktosidase transfizierter CHO-Zellen überprüft.

Der in Abb. 4.4.B dargestellte Western Blot resultiert aus der Proteinauftrennung in einer 15 % SDS-Gelelektrophorese und veranschaulicht die Expression der C-terminalen Deletion  $\Delta 1$ -352 (35 kD), deren konstante Region lediglich 4 Domänen besitzt. Die Mutante  $\Delta 1$ -175, bei der sechs Domänen deletiert sind, ist mit einer geschätzten Masse von 20 kD ebenfalls mit dem ECL-System detektierbar. Diese Mutanten sind sowohl mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908), als auch mit Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) im Western Blot nachweisbar.

Wie aus Abb. 4.4.C ersichtlich, reagiert im Gegensatz dazu die N-terminale Deletionsmutante ∆aa8-15 nicht mit dem Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718). Sie ist lediglich mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) zu detektieren. Dieses Phänomen wird in Kapitel 5.1. diskutiert.

Tabelle 4.1. faßt die Ergebnisse der Western Blot-Studien der Mutanten zusammen.

Protein	Masse	Nachweis im	Reaktion mit	Reaktion mit
	[kD]	Western Blot	Schaf Antikörper	Kaninchen Antikörper
wt1-673	68	+	+	+
Δ1-641	66	+	+	+
Δ1-500	51	+	+	+
Δ1-352	35	+	+	+
Δ1-175	20	+	+	+
∆aa8-15	67,2	+	_	+

#### Tabelle 4.1.: Expressionsnachweis der Konstrukte im Western Blot mit verschiedenen Antikörpern

Der Annexin VI Wildtyp und die aufgeführten C-terminalen Deletionsmutanten sind sowohl mit dem Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718), als auch mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) im Western Blot nachweisbar. Die N-terminale Deletion  $\Delta aa8-15$  kann lediglich mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) detektiert werden. Die geschätzten Proteinmassen der Mutanten sind angegeben.

## 4.3. Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation von Annexin VI

# 4.3.1. Identifikation von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten transfizierten Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Um die intrazelluläre Lokalisation des Annexin VI und der Annexin VI-Mutanten in transfizierten CHO-Zellen zu identifizieren und komparieren, werden die exprimierten Proteine in der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert. Die in Abb. 4.5. dargestellten representativen Immunfluoreszenzen beschreiben die intrazelluläre Verteilung und Expression von Annexin VI Wildtyp und Mutanten unter Zuhilfenahme des primären Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörpers (1CO908). In Abb. 4.5.A liefert die Annexin VI-Überexpression in einer transfizierten CHO-Zelle grün-fluoreszierende Signale. Diese zeigen sich sowohl feinfleckig in der Zelle verteilt, als auch deutlich an der Plasmamembran konzentriert. In der Umgebung befinden sich nicht transfizierte Zellen. Die mit Bisbenzimid gefärbten Zellkerne heben sich unter UV-Licht bläulich ab.



Annexin VI



≅ aa8-15



≅ 1-35**2** 

≅ 1-175

#### Abb. 4.5.: Immunfluoreszenz-Analyse der Überexpression von rekombinanten Annexin VI und Annexin VI-Mutanten

 $1 \times 10^5$  CHO-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Cover Slips ausplattiert und mit Plasmid-DNA von Annexin VI Wildtyp (A),  $\Delta aa8-15$  (B),  $\Delta 1-352$  (C) und  $\Delta 1-175$  (D) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) inkubiert. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden Cy 2 (grün)-konjugierte Esel Anti-Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente verwendet. In A und D wurde eine Kernfärbung mit 0,001% Dapi durchgeführt. Die Immunfluoreszenzen wurden photographisch dokumentiert. Die Verdünnungen der eingesetzten Antikörper sind Kapitel 2.5. zu entnehmen.

Die Darstellung der N-terminalen Deletionsmutante  $\Delta aa8-15$  (Abb. 4.5.B) läßt keine morphologischen Differenzen zum Annexin VI Wildtyp erkennen: Die interne Deletion führt in der Immunfluoreszenz zu keinen phänotypischen Veränderungen des intrazellulären Verteilungsmusters, einschließlich der plasmamembranösen Signale. Über die Zelle verteilte feinpunktierte Fluoreszenzen und plasmamembranöse Anreicherungen dominieren sowohl beim Nachweis der C-terminalen Deletion  $\Delta 1-641$ , als auch bei  $\Delta 1-$ 500. Diese Mutanten entbehren ungefähr eine halbe bzw. zwei Domänen der konstanten Region. Der Nachweis der beiden Konstrukte erfolgte nicht in der in Abb. 4.5. dargestellten Versuchsreihe, sondern ist in darauffolgenden Immunfluoreszenzen bestätigt worden. Die Deletion von vier ( $\Delta 1-352$ ) A/B-Schleifen und somit Kalzium- bzw. Phospholipidbindungsstellen führt ebenfalls nicht zu einem veränderten Signalmuster in der Immunfluoreszenz verglichen mit der Darstellung des Annexin VI Wildtyps (Abb. 4.5.C).

Abb. 4.5.D zeigt die Analyse der C-terminalen Deletion  $\Delta 1$ -175, welcher es an sechs Domänen und somit sechs A/B-Schleifen mangelt. Die Detektion dieses 20 kD Proteins in der Immunfluoreszenz liefert über die gesamte Zelle verteilte konfluierende, feinpunktierte Signale. Eine deutliche Betonung plasmamembranöser Fluoreszenzen ist nicht erkennbar.

Der Verlust von sechs Domänen der konstanten Region und die hieraus resultierende Beschränkung auf lediglich zwei hochaffine Kalzium- und Phospholipidbindungsstellen könnte zu einer Veränderung des Membranbindungsverhaltens führen.

Mit Hilfe einer abgewandelten Methodik lassen sich die Mutanten  $\Delta 1$ -641,  $\Delta 1$ -500 und  $\Delta 1$ -352 als fluoreszierende Klumpen in Zellkernnähe darstellen. Als einzige Änderung gegenüber der in Kapitel 3.10. beschriebenen Immunfluoreszenz-Durchführung werden hierbei unspezifische Bindungstellen serumfrei blockiert. Diese Beobachtung wird in Kapitel 5.2.2. diskutiert.

# 4.3.2. Nachweis von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in Membranpräparationen transfizierter Zellen

Um die Beobachtungen der immunfluoreszensischen Untersuchungen zu verifizieren, wurden Membranpräparationen transfizierter CHO-Zellen durchgeführt und mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert. Abb. 4.6. gibt die Methodik der Membranpräparation schematisch wieder.

59



Transfektion von CHO-Zellen mit Anx6-Expressionsvektoren



1x10<sup>6</sup> CHO-Zellen wurden kultiviert und mit rekombinanter Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die adhärenten Zellen gelöst und in French Press Puffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Einem mechanischen Zellaufschluß folgte eine Zentrifugation, welche einen cytosolischen Überstand und ein membranös angereichertes Pellet lieferte. Der Überstand wurde durch Ultrazentrifugation weiter aufgereinigt, die mit Zellorganellen und Membranfraktionen ange-reicherten Pellets wurden in French Press Puffer (siehe oben) aufgenommen und nochmals mit Hilfe der French Pressure Cell mechanisch lysiert. Eine weitere Ultrazentrifugation lieferte ein Membranpellet.

Abb. 4.7. stellt den Western Blot, der in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten cytosolischen und membranösen Proben von Annexin VI und Mutanten transfizierten CHO-Zellen dar. Bei gleicher eingesetzter Proteinmenge kann der Annexin VI Wildtyp im Cytosol und mit weitaus stärkeren Signalen im membranösen Pellet nachgewiesen werden: Aus der Quantifizierung der Bandenintensität ergibt sich bei gleicher Meßfläche ein Verhältnis von Cytosol zu Membran von ungefähr 1:6. Entsprechende Beobachtungen werden auch bei der Analyse der N-terminalen Deletion  $\Delta aa8-15$  gemacht. Für eine Beeinflussung des Membranbindungsverhaltens von Annexin VI durch die N-terminale Deletion von acht Aminosäuren gibt es in diesem Versuchsansatz keinerlei Hinweise. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen in der Immunfluoreszenz. Die Charakterisierungen der C-terminalen Deletionsmutanten  $\Delta 1-641$ ,  $\Delta 1-$ 500 und  $\Delta 1-352$  liefern analog zum Annexin VI Wildtyp dominierende membranöse Signale, welche bei gleicher Meßfläche die Bandenintensität des Cytosols um das sechs- bis neunfache übertreffen. Diese Ergebnisse bestätigen somit ebenfalls die immunfluoreszensischen Studien. Die Signalintensitäten differieren zwischen dem Probenmaterial der verschiedenen Expressionsvektoren, was bei gleichen analysierten Proteinmengen auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz hindeutet. Bei den Mutanten  $\Delta 1$ -641,  $\Delta 1$ -500 und  $\Delta 1$ -352 sind nur schwache cytosolische Signale zu erahnen.



#### Abb. 4.7.: Western Blot-Analyse von Cytosol und Membran-angereicherten Fraktionen transfizierter CHO-Zellen

 $1x10^{6}$  CHO-Zellen wurden ausplattiert und transfiziert. Die Membranpräparation wurde 24 Stunden nach Transfektion mit Plasmid-DNA von Annexin VI,  $\Delta aa8-15$ ,  $\Delta 1-641$ ,  $\Delta 1-500$  und  $\Delta 1-352$  durchgeführt. 30 µg des erhaltenen cytosolischen Überstandes (Cytosol) und des membranösen Pellets (Membran) wurden in einer 10 % SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Immunodetektion erfolgte mit primärem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und sekundärem Peroxidase-konjugiertem Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper (siehe Kapitel 2.5.). Als positive Kontrolle wurde 1 µg bovines Annexin VI eingesetzt. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des ECL-Systems nachgewiesen. Die Molekulargewichtsmarkierungen sind eingefügt.

Konstrukt	Cytosol	Membran
Annexin VI	14,0 %	86,0 %
∆aa 8-15	14,6 %	85,4 %
∆ <b>1-641</b>	15,1 %	84,9 %
∆ <b>1-500</b>	9,8 %	90,2 %
∆ <b>1-352</b>	13,9 %	86,1 %

#### Tab. 4.2.: Bestimmung der relativen Intensität der Western Blot-Banden aus Abb. 4.7.

Der Western Blot ist eingescannt und die relative Intensität der detektierten Banden in der OD-Bestimmung pro mm<sup>2</sup> Fläche quantifiziert worden. Aus der Summe der OD-Werte eines Konstruktes (rel. Bandenintensität Cytosol + Membran) ist der prozentuale Anteil der cytosolischen bzw. membranösen Fraktion errechnet und tabellarisch dargestellt worden.

Tabelle 4.2. stellt die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Bandenintensität des Western Blots im einzelnen dar.

Der Annexin VI Wildtyp und die in diesem Kapitel behandelten Mutanten werden mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes überwiegend Membranassoziiert nachgewiesen. Lediglich ein geringer Teil der Proteine befindet sich in der cytosolischen Fraktion. Eine Beeinflussung der Membranaffinität des Annexin VI durch C-terminale Deletionen von bis zu vier Domänen der konstanten Region ist mit der angewandten Methodik nicht nachweisbar.

## 4.3.3. Cytosolische Lokalisation der C-terminalen Deletionsmutante ∆1-175

Die Charakterisierung der C-terminalen Deletion  $\Delta 1$ -175 hebt sich von den Ergebnissen der übrigen Mutanten (Kapitel 4.3.2.) ab. Abb. 4.8.A demonstriert den Western Blot von Membranpräparationen aus Annexin VI und  $\Delta 1$ -175 transfizierten CHO-Zellen. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes von  $\Delta 1$ -175 (20 kD) sind die Proteine in einem 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt worden.



## Abb. 4.8.: Vergleich der Western Blot-Analyse von Cytosol und Membran-angereicherten Fraktionen aus Annexin VI Wildtyp und ∆1-175 transfizierten CHO-Zellen

A: Membranpräparationen von Annexin VI und Δ1-175 transfizierten Zellen. Jeweils 30 μg Protein wurden in einer 15 % SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Nachweis der Proteinexpression wurden ein primärer Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper benutzt.

B: 30 µg Protein des Probenmaterials wurden in einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt, um als interne Kontrolle die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nachzuweisen. Zur Immunodetektion wurden ein primärer Kaninchen Anti-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Antikörper (A9521) und ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt.

Die Antikörper wurden verdünnt verwendet (siehe Kapitel 2.5.). Die Molekulargewichte der mit dem ECL-System detektierten Proteine sind angegeben.

Die Untersuchung des Annexin VI Wildtyps bestätigt reproduzierbar die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.2.. Die membranösen Signale übertreffen in ihrer Intensität die cytosolische Detektion in diesem Ansatz sogar um das Achtfache (siehe Tab. 4.3.). Anders gestaltet sich der Nachweis der Deletionsmutante  $\Delta$ 1-175: Im Vergleich zur Ausprägung der Proteinbanden des Annexin VI Wildtyp verschieben sich die Signalintensitäten von den membranösen Fraktionen zum Cytosol, wobei ein approximatives Verhältnis von 1 : 1 erreicht wird.

Konstrukt	Cytosol	Membran
Annexin VI	10,8 %	89,2 %
∆ <b>1-175</b>	45,4 %	54,6 %

**Tab. 4.3.:** Prozentualer Vergleich der relativen Bandenintensität cytosolischer bzw. membranöser Fraktionen aus Abb. 4.8. Nach dem Einscannen des Western Blots ist die relative Intensität der detektierten Banden in der OD-Bestimmung pro mm<sup>2</sup> Fläche bestimmt worden. Die dargestellten Prozentwerte errechnen sich analog zu Tab. 4.2..

Die Anreicherung cytosolischer Proteine ist mit dem internen Nachweis der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (105 kD) überprüft worden (Abb. 4.8.B). Dieses cytosolische Enzym des Pentosephosphatweges katalysiert die Metabolisierung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglucono-δ-lacton (Horecker, 1976; Wood, 1985). In parallelen Experimenten ist der Nachweis des LDL-Rezeptors in den membranösen Fraktionen Rezeptor-überexprimierender CHO-Zellen jedoch nicht gelungen.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Deletion von sechs A/B-Schleifen und somit Kalzium- und Phospholipidbindungsstellen ( $\Delta$ 1-175) die Affinität des Annexin VI zu Membranen beeinträchtigt. Die C-terminale Deletionsmutante  $\Delta$ 1-175 ist in dem vorliegenden Experiment zu ungefähr 50 % im Cytosol lokalisiert nachgewiesen worden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Analysen in der Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 4.3.1.).

## 4.3.4. Kalzium-abhängige Membranbindung von Annexin VI

Annexin VI wird der Gruppe der Kalzium-abhängigen Phospholipidbindungsproteine zugeordnet (Gerke u. Moss, 1997). Es werden jedoch auch Kalzium-unabhängige Bindungsmechanismen des Annexin VI beschrieben (Turpin et al., 1998). Zur Analyse und Quantifizierung des Einflusses der Kalziumbindung auf die Membranassoziation von Annexin VI sind membranös angereicherte Proben Annexin VI überexprimierender CHO-Zellen (siehe Kapitel 4.3.2.) mit EGTA behandelt worden. Hierbei sind EGTAhaltige Lösungen unterschiedlicher Molaritäten verwendet worden, um das Ausmaß der Kalziumabhängigkeit zu untersuchen. Nach der EGTA-Behandlung sind die Proben nochmals ultrazentrifugiert, Pellet und Überstand getrennt analysiert worden. Die Proben sind in einer 10 % SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt worden. Abb. 4.9. veranschaulicht den entsprechenden Western Blot.



Abb. 4.9.: Western Blot-Analyse EGTA-behandelter membranöser Fraktionen Annexin VI transfizierter CHO-Zellen 1x10<sup>6</sup> Zellen wurden mit Annexin VI Plasmid-DNA transfiziert. 24 Stunden später wurden Membranpräparationen hergestellt und anschließend mit EGTA-Lösungen (siehe Kapitel 3.12.) unterschiedlicher Molaritäten 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Probenmaterial wurde nochmals 60 Minuten bei 100.000 rpm ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 % Triton X-100, 50 mM Tris, 80 mM NaCl aufgenommen. 30 µg Protein der jeweiligen Proben wurden in einer 10 % Gelelektrophorese analysiert. Der Western Blot detektiert das Annexin VI in Pellet und Überstand aus der Ultrazentrifugation von Membranfraktionen nach Behandlung mit 0 mM, 1 mM, 10 mM, und 25 mM EGTA. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung von primärem Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) und sekundärem Peroxidase-konjugiertem Kaninchen Anti-Schaf-Antikörper und schließlich mit Hilfe des ECL-Systems.

Die Signale der Annexin VI-Detektion in den mit EGTA-Lösung behandelten Proben sind in den Überständen von höherer Intensität als in den dazugehörigen Pellets: Bei Inkubation mit 0 mM EGTA-Lösung ist die relative Bandenintensität des Überstandes im Vergleich zum Pellet mehr als doppelt so hoch. Mit sukzessiver Steigerung der EGTA-Molarität nimmt jedoch die Ausprägung der Banden in den Pellets stetig zu. Überstand- und Pellet-Signal der mit 25 mM EGTA behandelten Proben nähern sich einem Verhältnis von 1 : 1. Die prozentuale Auswertung der Bestimmung der relativen Bandenintensität ist im Detail Tabelle 4.4. zu entnehmen. Eine zunehmende EGTA-Konzentration und ein dadurch bedingter Kalziumentzug des Probenmaterials resultiert somit in einer Zunahme des Annexin VI-Anteils in der Pellet-Fraktion.

EGTA-Molarität	Überstand	Pellet
0 mM	68,9 %	31,1 %
1 mM	61,7 %	38,3 %
10 mM	59,3 %	40,7 %
25 mM	56,8 %	43,2 %

Tab. 4.4.: Bestimmung der relativen Intensität der Western Blot-Banden aus Abb. 4.9.

Aus dem eingescannten Western Blot ist die relative Intensität der detektierten Banden in der OD-Bestimmung pro mm<sup>2</sup> Fläche quantifiziert worden. Für die jeweilige EGTA-Behandlung ist aus der Summe der OD-Werte (rel. Bandenintensität Überstand + Pellet) der prozentuale Anteil der Überstand- bzw. Pellet-Signalstärke errechnet und tabellarisch dargestellt worden.

# 4.3.5. Analyse der intrazellulären Verteilung von Annexin VI mit Hilfe von Sucrosegradienten

Um die kontrovers diskutierte intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI näher zu charakterisieren, bedarf es der Etablierung eines Analyseverfahrens, welches die Verteilung des Annexin VI in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten weiter differenziert. In initialen Studien sind einzelne zelluläre Fraktionen Annexin VI überexprimierender CHO-Zellen im Sucrosegradienten aufgetrennt worden.

Aufgeschlossene Zellen sind einem Gradienten aus 38 %-, 32 %-, 26 %-, 20 %-, 14 %und 8 %-Sucroselösungen zugesetzt worden. Nach 18stündiger Ultrazentrifugation ist der Sucrosegradient in Form von zwölf Aliquots entnommen worden. Abb. 4.10. zeigt die Überprüfung der Dichte der Proben mit einem Refraktometer.




Die Proben sind anschließend in einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt worden. Der dargestellte Western Blot (Abb. 4.11.) zeigt den Nachweis von Annexin VI in den einzelnen Fraktionen (Probe 1-12) des Gradienten. Bei gleichen eingesetzten Volumina nimmt die Signalintensität der Annexin VI-Detektion stetig von Probe 1 (oberste Fraktion) bis Probe 12 (unterste Fraktion) zu. Hiervon ausgenommen ist die Probe 9, welche sich durch stärkere Signale von den benachbarten Fraktionen abhebt.



Abb. 4.11.: Western Blot-Analyse des Sucrosegradienten aus Annexin VI transfizierten CHO-Zellen Jeweils 100 µl der Aliquots des Sucrosegradienten wurden in einer 10 % SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Annexin VI-Nachweis erfolgte mit einem primären Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) und einem sekundären Peroxidase-konjugiertem Kaninchen Anti-Schaf-Antikörper (siehe Kapitel 2.5.). Als positive Kontrolle wurde 1 µg bovines Annexin VI eingesetzt. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Der Röntgenfilm wurde 1 Minute exponiert. Die Probe 1 entspricht der obersten, die Probe 12 der untersten Fraktion des Gradienten.

Der Western Blot ist eingescannt und die relative Intensität der detektierten Banden in der OD-Bestimmung pro mm<sup>2</sup> Fläche quantifiziert worden. Nach Ermittlung der Proteinkonzentration ist die relative Intensität pro 10 µg Protein der Gradienten-Proben berechnet und in Abb. 4.12. dargestellt worden.

Die Abb. 4.12. bestätigt konzentrierte Anreicherungen von Annexin VI in den Fraktionen 9 und 12. In den Proben 10 und 11 ist im Vergleich hierzu deutlich weniger Annexin VI nachweisbar. Auf dem quantitativ niedrigsten Niveau ist das Annexin VI in den Gradientenfraktionen 1 bis 6 gleichmäßig verteilt.

Eine Identifikation von zellulären Kompartimenten in den Fraktionen des Sucrosegradienten ist im Rahmen dieser experimentellen Arbeit nicht möglich gewesen.



**Abb. 4.12.:** Charakterisierung von Annexin VI in Sucrosegradienten von CHO-Zellextrakten Der Graph beschreibt die relative Intensität (OD mm<sup>2</sup>) der bei der Western-Blot-Immunodetektion von Annexin VI in den einzelnen Gradientenfraktionen erhaltenen Banden. Diese wurde für 10 µg Protein pro Probe berechnet. Die Proteinkonzentration der Aliquots wurde zuvor nach Lowry bestimmt. Die Auswertung bezieht sich auf den in Abb. 4.11. demonstrierten vorläufigen Western Blot.

### 4.3.6. Colokalisation von Annexin VI und Annexin II

Annexin II, ein ausführlich studiertes Mitglied der Annexin-Familie, wird intrazellulär plasmamembranös und frühendosomal assoziiert nachgewiesen (Thiel et al., 1992). Um die Lokalisation des Annexin VI mit der bereits charakterisierten intrazellulären Verteilung des Annexin II zu vergleichen, sind Colokalisationsstudien in der Immunfluoreszenz mit Annexin VI und Annexin II coexprimierenden CHO-Zellen durchgeführt worden.



#### Abb. 4.13.: Immunfluoreszenz-Analyse Annexin VI und Annexin II cotransfizierter CHO-Zellen

1x10<sup>5</sup> Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Cover Slips ausplattiert und mit pcDNAanx6 (A) und pCMV5-EX-AII (B) cotransfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit primärem Antikörper inkubiert. Hierbei wurden Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und Maus Anti-Annexin II-Antikörper (H 28) verwendet. Diese wurden durch Cy 2(grün)-konjugierten Esel Anti-Kaninchen-Antikörper und Cy 3(rot)-konjugierten Esel Anti-Maus-Antikörper dargestellt. Beide Signale sind in C superpositioniert abgebildet.

Die Immunfluoreszenz in Abb. 4.13. stellt das Annexin VI grün- (A), das Annexin II rot-markiert (B) dar. Die Literatur bestätigend ergibt der Nachweis des Annexin II sowohl plasmamembranöse, als auch in der Zelle verteilte Signale. Wie in Kapitel 4.3.1. beschrieben, prägen Fluoreszenzen an der Plasmamembran und punktierte Signalmuster in der Zelle die Darstellung des Annexin VI. Annexin VI und Annexin II werden in der transfizierten CHO-Zelle teilweise colokalisiert nachgewiesen (gelbe Signale in C). Das Ergebnis dieser Studie legt nahe, daß Annexin VI partiell in frühen Endosomen und an der Plasmamembran mit Annexin II colokalisiert.

# 4.4. Rolle von Annexin VI bei der LDL-Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen

# 4.4.1. Internalisierung und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL in Annexin VI überexprimierenden Zellen

Um die Rolle des Annexin VI in der LDL-Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen zu untersuchen, sind die Aufnahme und Degradation von radiomarkiertem LDL in transfizierten CHO-Zellen bestimmt worden.

Vorausgehende Arbeiten haben gezeigt, daß die Transfektion von CHO-Zellen ausschließlich mit Annexin VI Plasmid-DNA weder die Internalisation, noch die Degradation von <sup>125</sup>I-LDL im Vergleich zu ß-Galactosidase überexprimierenden beeinflußt (Grewal et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit ist daher eine Coexpression von Annexin VI und humanem LDL-Rezeptor in CHO-Zellen durchgeführt worden.

In Abb. 4.14. sind Aufnahme und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL in cotransfizierten Zellen nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C mit lediglich LDL-Rezeptor transfizierten CHO-Zellen verglichen worden. Die Cotransfektion von LDL-Rezeptor zusammen mit Annexin VI führt in fünf unabhängigen Experimenten im Mittel zu einer 25 % Stimulation der Internalisation von radiomarkiertem LDL im Vergleich zu ausschließlich LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen (p < 0,0005). Die Verringerung der <sup>125</sup>I-LDL-Aufnahme um 62 % in β-Galaktosidase transfizierten Zellen verglichen mit LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen bestätigt eine erfolgreiche negative Kontrolle des experimentellen Ansatzes (p < 0,0001).

Bei der Untersuchung der intrazellulären Verstoffwechselung von LDL führt die Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor im Mittel zu einem 23 % Anstieg der Degradation von <sup>125</sup>I-LDL im Vergleich zu LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen (p < 0,006). Die Stimulation der Degradation von radiomarkiertem LDL ist in  $\beta$ -Galaktosidase überexprimierenden Zellen verglichen mit LDL-Rezeptor transfizierten Zellen um 46 % verringert (p < 0,0001).



#### Abb. 4.14.: Internalisation und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL in Annexin VI transfizierten CHO-Zellen

 $3x10^{\circ}$  CHO-Zellen wurden mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), mit LDL-Rezeptor und  $\beta$ -Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) transfiziert. Die Daten resultieren aus Doppelwerten, von denen die unspezifische Aufnahme subtrahiert und somit die Rezeptor-vermittelte Internalisation errechnet wurde. Diese wurde in n facher Stimulation verglichen mit LDL-Rezeptor transfizierten Zellen ausgedrückt. Bei einer Standardabweichung von  $s_{LDL-R} = 0,1216$  wurde LDL-R = 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus fünf unabhängigen Experimenten mit dreifachem Probenansatz. Die Mittelwerte der aus Normalverteilungen stammenden Stichproben wurden mit Hilfe des Student t-Test miteinander verglichen: p< 0,0005 für LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*\*\*), p< 0,0001 für LDL-R und  $\beta$ Gal (\*\*\*).

Zur Bestimmung der Degradation von <sup>125</sup>I-LDL wurden die Zellen 6 Stunden mit dem Liganden inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgenommen und das abgebaute radiomarkierte LDL gemessen (siehe Kapitel 3.9.2.). Die spezifische Degradation ist in n facher Stimulation verglichen mit LDL-Rezeptor transfizierten Zellen (LDL-R = 1, Standardabweichung s<sub>LDL-R</sub> = 0,1012) angegeben und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) aus fünf unabhängigen Experimenten mit Dreifachwerten: p< 0,006 für LDL-R und LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*\*), p< 0,0001 für LDL-R und  $\beta$ Gal (\*\*\*).

Der in Kapitel 4.2.2. präsentierte Western Blot demonstriert gleiches LDL-Rezeptor Expressionsniveau in LDL-Rezeptor und Annexin VI cotransfizierten und ausschließlich LDL-Rezeptor transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebene Stimulation der Internalisation und Degradation von LDL durch Annexin VI (Grewal et al., 2000).

# 4.4.2. Aufnahme und Abbau von <sup>125</sup>I-LDL in Annexin VI-Mutanten überexprimierenden Zellen

Dem Nachweis des stimulatorischen Effektes der Annexin VI-Überexpression auf die LDL-Rezeptor-vermittelte Endocytose von Lipoproteinen folgt nun die Untersuchung

des Einflusses struktureller Veränderungen auf das funktionelle Verhalten von Annexin VI.

### 4.4.2.1. Funktionelle Analyse der C-terminalen Annexin VI-Mutanten

Um spezifische Effekte des C-terminalen Verlustes von sechs Domänen möglichst detailliert herauszuarbeiten, ist die <sup>125</sup>I-LDL-Aufnahme in  $\Delta$ 1-175 transfizierten CHO-Zellen im kinetischen Verlauf an sechs Zeitpunkten dokumentiert worden.

Abb. 4.15. demonstriert die spezifische Internalisation von radiomarkiertem LDL angegeben in n facher Stimulation bezogen auf die Aufnahmewerte nach 5 Minuten von ß-Galaktosidase transfizierten Zellen.



Abb. 4.15.: <sup>125</sup>I-LDL-Aufnahmekinetik in ∆1-175 transfizierten CHO-Zellen

Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt wurden  $1 \times 10^5$  Zellen kultiviert und transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion mit β-Galaktosidase (β-Gal), β-Galaktosidase und LDL-Rezeptor (LDL-R), LDL-Rezeptor und Δ1-175 (LDL-R+Δ1-175), LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) wurden die Zellen gekühlt. Der Ligand wurde 30 Minuten bei 4 °C gebunden. Freies <sup>125</sup>I-LDL wurde entfernt und der Ligand bei 37 °C 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten internalisiert. Nach der Zelllyse wurde die Radioaktivität der Proben bestimmt. Die Werte werden als n fache Stimulation verglichen mit β-Galaktosidase transfizierten Zellen angegeben (1,0 bei t = 5 min) und repräsentieren die Mittelwerte (± Standardabweichung) aus zwei unabhängigen Experimenten mit dreifachen Proben.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten ist die Aufnahme in LDL-Rezeptor transfizierten Zellen gegenüber den  $\beta$ -Galaktosidase überexprimierenden Zellen im Mittel 2,1 fach stimuliert (p < 0,0005). Coexpression von LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 führt gemittelt zu einer 2,2 fachen Stimulation im Vergleich zu den Kontrollzellen (p < 0,03). Die Stimulationswerte von lediglich LDL-Rezeptor und LDL-Rezeptor +  $\Delta$ 1-175 transfizierten Zellen unterscheiden sich im Student t-Test nicht signifikant (p = 0,981). Der Graph beschreibt jedoch eine langsamere Aufnahme von <sup>125</sup>I-LDL in LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 cotransfizierten Zellen verglichen mit LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen. Als positive Kontrolle dient die Aufnahme von <sup>125</sup>I-LDL in LDL-Rezeptor und Annexin VI cotransfizierten Zellen. Hier ist die Internalisation im Vergleich zu lediglich β-Galaktosidase überexprimierenden Zellen im Mittel 3,2 fach gesteigert (p < 0,0008).

Um diesen fehlenden stimulatorischen Effekt von  $\Delta 1$ -175 in der Lipoproteinaufnahme zu verifizieren und das Verhalten der C-terminalen Deletion bei der Degradation von LDL zu analysieren, sind transfizierte CHO-Zellen 6 Stunden bei 37 °C mit <sup>125</sup>I-LDL inkubiert worden. Abb. 4.16. stellt die Internalisation und Degradation von radiomarkiertem LDL in n facher Stimulation bezogen auf LDL-Rezeptor transfizierte Zellen dar.



#### Abb. 4.16.: Internalisation und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL in ∆1-175 transfizierten CHO-Zellen

 $3x10^{5}$  CHO-Zellen wurden mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), mit LDL-Rezeptor und  $\beta$ -Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 (LDL-R+  $\Delta$ 1-175), mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) transfiziert. Die Rezeptor-vermittelte Aufnahme wurde in n facher Stimulation verglichen mit LDL-Rezeptor transfizierten Zellen (LDL-R = 1, Standardabweichung s<sub>LDL-R</sub> = 0,0370) dargestellt und repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) aus sechs unabhängigen Experimenten mit dreifachem Probenansatz. Die Daten wurden mit Hilfe des Student t-Test auf Signifikanz überprüft: p = 0,83 für LDL-R und LDL-R+ $\Delta$ 1-175, p< 0,02 für LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*), p< 0,0006 für LDL-R und  $\beta$ Gal (\*\*\*).

Die Degradation von <sup>125</sup>I-LDL wurde wie in Kapitel 3.9.2. beschrieben bestimmt und in n facher Stimulation verglichen mit LDL-Rezeptor transfizierten Zellen (LDL-R = 1, Standardabweichung  $s_{LDL-R} = 0,0638$ ) angegeben. Sie repräsentiert den Mittelwert (± Standardabweichung) aus fünf unabhängigen Experimenten mit Dreifachwerten: p = 0,14 für LDL-R und LDL-R+ $\Delta$ 1-175, p< 0,02 für LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*), p< 0,0004 für LDL-R und  $\beta$ Gal (\*\*\*).

In sechs unabhängigen Experimenten ist die Aufnahme von <sup>125</sup>I-LDL in LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 cotransfizierten Zellen im Vergleich mit LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen nicht signifikant stimuliert (p = 0,83). Die Coexpression von LDL-Rezeptor und Annexin VI führt zu einer im Mittel 1,2 fachen Stimulation der Lipoprotein-Internalisation gegenüber ausschließlich LDL-Rezeptor transfizierten Zellen (p < 0,02). Bei den ß-Galaktosidase transfizierten negativen Kontrollzellen ist die Aufnahmestimulation verglichen mit LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen um gemittelte 68 % verringert (p < 0,0006).

Die Degradation von <sup>125</sup>I-LDL ist in fünf unabhängigen Experimenten in LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 coexprimierenden Zellen kompariert mit LDL-Rezeptor transfizierten CHO-Zellen ebenfalls nicht signifikant stimuliert worden (p = 0,14). Im Vergleich zur LDL-Rezeptor Überexpression ist bei der positiven Kontrolle (LDL-R+Anx6) die Stimulation der Degradation um 22 % erhöht (p < 0,02), in den negativen Kontrollzellen (β-Gal) um 44 % verringert (p < 0,0005).

Die C-terminale Deletion von sechs Domänen führt zum Verlust der Stimulation der Rezeptor-vermittelten Aufnahme und Verstoffwechselung von Lipoproteinen durch Annexin VI.



Abb. 4.17.: <sup>125</sup>I-LDL Internalisation und Degradation in ∆1-352 transfizierten CHO-Zellen

 $3x10^{5}$  CHO-Zellen wurden mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), mit LDL-Rezeptor und  $\beta$ -Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-R und  $\Delta$ 1-352 (LDL-R+ $\Delta$ 1-352), mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) transfiziert. <sup>125</sup>I-LDL (4-5  $\mu$ g/ml  $\pm$  50fachem Überschuß an kaltem LDL) wurde 24 Stunden später hinzugefügt. Die Zellen wurden 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend wie in den Kapiteln 3.9.1. und 3.9.2. beschrieben behandelt. Die spezifische Internalisation und Degradation werden in n facher Stimulation gegenüber ausschließlich LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen dargestellt. Es handelt sich um die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus jeweils zwei exemplarischen Experimenten mit dreifachem Ansatz.

Das funktionelle Verhalten des Annexin VI scheint durch den Verlust von vier Domänen der konstanten Region jedoch nicht beeinflußt zu sein. Dieses ergeben vorläufige Untersuchungen der C-terminalen Deletionsmutante  $\Delta 1$ -352. Abb. 4.17. demonstriert die Mittelwerte aus zwei exemplarischen 6stündigen <sup>125</sup>I-LDL Aufnahme und Degradations-Experimenten. Nach diesen vorläufigen Ergebnissen verhält sich  $\Delta$ 1-352 bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose von radiomarkiertem LDL wie der Annexin VI Wildtyp: Die Cotransfektion von LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-352 führt ebenso wie die Coexpression von LDL-Rezeptor und Annexin VI zu einer 1,2 fachen Stimulation der Aufnahme und einer 1,3-1,4 fach erhöhten Degradation von <sup>125</sup>I-LDL im Vergleich zu lediglich LDL-Rezeptor transfizierten Zellen.

### 4.4.2.2. Funktionelle Analyse der N-terminalen Annexin VI-Mutanten

Um die Rolle des N-Terminus im endocytotischen Verhalten des Annexin VI zu untersuchen, sind funktionelle Studien mit der N-terminalen Deletionsmutanten  $\Delta aa8-15$ durchgeführt worden. Diese Mutante hat sich bei der Analyse der intrazellulären Lokalisation in den Kapiteln 4.3.1. und 4.3.2. analog zum Annexin VI Wildtyp verhalten. Auch in  $\Delta aa8-15$  transfizierten Zellen ist die <sup>125</sup>I-LDL-Internalisation mit Hilfe von Aufnahmekinetiken untersucht worden (Abb. 4.18.).





1x10<sup>5</sup> Zellen wurden für den jeweiligen zu untersuchenden Zeitpunkt subkultiviert und mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal),  $\beta$ -Galaktosidase und LDL-Rezeptor (LDL-R), LDL-Rezeptor und  $\Delta aa8-15$  (LDL-R+  $\Delta aa8-15$ ), LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen gekühlt und 30 Minuten bei 4 °C mit dem Liganden inkubiert (siehe Kapitel 3.9.1.). Freies <sup>125</sup>I-LDL wurde abgewaschen und der Ligand 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten bei 37 °C aufgenommen. Die <sup>125</sup>I-LDL-Internalisation wird als n fache Stimulation verglichen mit  $\beta$ -Galaktosidase transfizierten Zellen angegeben (1,0 bei t = 5 min) und repräsentiert die Mittelwerte (± Standardabweichung) aus zwei unabhängigen Experimenten mit dreifachem Probenansatz.

Die spezifische Aufnahme von radiomarkiertem LDL ist bezogen auf den 5 Minuten-Wert von ß-Galaktosidase transfizierten Zellen dargestellt. In diesem experimentellen Ansatz ist die Aufnahme in LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen gegenüber den ß-Gal-Kontrollzellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Mittel 4,5 fach gesteigert (p < 0,02). Die Coexpression von LDL-Rezeptor und  $\Delta$ aa8-15 führt zu einer 4,2 fachen mittleren Stimulation (p < 0,02). Ein Vergleich der relativen Stimulationen von LDL-Rezeptor und LDL-Rezeptor +  $\Delta$ aa8-15 transfizierten Zellen im Student t-Test bestätigt keine signifikanten Unterschiede (p = 0,178). Die Internalisation der positiven Kontrollzellen (LDL-R+Anx6) ist relativ zu ß-Galaktosidase überexprimierenden Zellen im Mittel 6,3 fach gesteigert (p < 0,008).

Die Ergebnisse der <sup>125</sup>I-LDL-Aufnahmekinetik werden in Analysen der 6stündigen Internalisation des Liganden bei 37 °C in  $\Delta$ aa8-15 transfizierten CHO-Zellen bestätigt (Abb. 4.19.). Bezogen auf die n fache Stimulation von ausschließlich LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen (LDL-R = 1) ist die Aufnahme von <sup>125</sup>I-LDL in LDL-Rezeptor und  $\Delta$ aa8-15 cotransfizierten Zellen nicht signifikant gesteigert (p = 0,34). Die Coexpression von LDL-Rezeptor und Annexin VI stimuliert die Liganden-Internalisation relativ zu LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen im Mittel um 22 % (p < 0,003). Die negative Kontrolle mit ß-Galaktosidase transfizierten Zellen ergibt eine Verringerung der Aufnahmestimulation im Vergleich zu LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen um 57 % (p < 0,004).





 $3x10^{5}$  CHO-Zellen wurden mit ß-Galaktosidase (ß-Gal), mit LDL-Rezeptor und ß-Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-R und  $\Delta aa8-15$  (LDL-R+  $\Delta aa8-15$ ), mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (LDL-R+Anx6) transfiziert. Die spezifische Internalisation und Degradation werden in n facher Stimulation gegenüber ausschließlich LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen (LDL-R = 1, Standardabweichung  $s_{LDL-R} = 0,1107$ ) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte (± Standardabweichung) aus vier unabhängigen Internalisations- und fünf Degradationsexperimenten mit Dreifach-Werten. Aus dem Vergleich der Mittelwerte der <sup>125</sup>I-LDL-Aufnahme ergeben sich folgende Signifikanzen: p = 0,34 für LDL-R und LDL-R+  $\Delta aa8-15$ , p < 0,003 für LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*\*), p < 0,004 für LDL-R und ß-Gal (\*\*).

Für die Degradationsmittelwerte errechnet der Student t-Test: p = 0,57 für LDL-R und LDL-R+ $\Delta aa8-15$ , p < 0,05 für LDL-R und LDL-R+Anx6 (\*), p < 0,005 für LDL-R und  $\beta$ -Gal (\*\*). (LDL-R = 1, Standardabweichung s<sub>LDL-R</sub> = 0,0635)

LDL-Rezeptor und  $\Delta aa8-15$  cotransfizierte Zellen sind ebenfalls nicht in der Lage, verglichen mit LDL-Rezeptor exprimierenden Zellen, die Degradation von radiomarkiertem LDL signifikant zu stimulieren (p = 0,57). Mit einer im Mittel 1,2 fachen Steigerung in LDL-Rezeptor und Annexin VI coexprimierenden Zellen wird der Versuchsansatz positiv kontrolliert (p < 0,05).

Trotz der Korrespondenz der intrazellulären Verteilung und des Membranbindungsverhaltens mit dem Annexin VI Wildtyp führt eine N-terminale Deletion der Aminosäuren 8 bis 15 zum Verlust des stimulatorischen Effektes auf die Internalisation und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL.

Die Aminosäuren Tyrosin und Serin an zehnter bzw. dreizehnter Position des N-Terminus sind potentielle Phosphorylierungsstellen von Annexin VI. Um die Bedeutung des Tyrosins im N-Terminus für das funktionelle Verhalten des Annexin VI einzuschätzen, sind erste Untersuchungen der Punktmutation aaTyr→Ala im Hinblick auf die Rezeptor-vermittelte Endocytose von Lipoproteinen durchgeführt worden. Abb. 4.20. beschreibt die 6stündige Aufnahme und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL bei 37 °C angegeben in n facher Stimulation relativ zu LDL-Rezeptor transfizierten CHO-Zellen.





24 Stunden nach der Transfektion mit  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal), mit LDL-Rezeptor und  $\beta$ -Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-R und  $\Delta$ aa8-15 (LDL-R+ $\Delta$ aa8-15), mit LDL-Rezeptor und aaTyr $\rightarrow$ Ala (LDL-R+aaTyr $\rightarrow$ Ala) wurde den Zellen <sup>125</sup>I-LDL (4-5 µg/ml ± 50fachem Überschuß an kaltem LDL) hinzugefügt. Die Zellen wurden nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C gemäß der Kapitel 3.9.1. und 3.9.2. behandelt. Die spezifische Aufnahme und Degradation von <sup>125</sup>I-LDL wird in n facher Stimulation relativ zu LDL-Rezeptor transfizierten Zellen angegeben. Es werden die Mittelwerte (± Standardabweichung) aus jeweils zwei exemplarischen Experimenten mit dreifachem Proben-Ansatz dargestellt.

Es handelt sich um Mittelwerte aus zwei vorläufigen Experimenten. Wie oben beschrieben sind die LDL-Rezeptor und  $\Delta aa 8-15$  cotransfizierten Zellen nicht in der Lage, die Internalisation und Degradation der Lipoproteine im Vergleich zu LDL-Rezeptor exprimierenden Zellen deutlich zu stimulieren. Anders verhält sich die N-terminale Punktmutation aaTyr $\rightarrow$ Ala, welche sowohl die Aufnahme, als auch die Degradation von radiomarkiertem LDL im Mittel 1,3 fach steigert (LDL-R = 1).

Die Stimulation der Lipoprotein-Aufnahme in aaTyr→Ala transfizierten Zellen kann in vier unabhängigen 1stündigen Internalisationsexperimenten von <sup>125</sup>I-LDL bei 37 °C bestätigt werden. In Abb. 4.21. wird die aufgenommene Radioaktivität pro mg Protein des Zelllysates angegeben.

Im Vergleich zu LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen führt die Coexpression von LDL-Rezeptor und aaTyr $\rightarrow$ Ala gemittelt zu einer 1,2 fachen Stimulation der Internalisierung von <sup>125</sup>I-LDL (p < 0,05). Die Aktivität von LDL-Rezeptor und  $\Delta$ aa8-15 cotransfizierten Zellen unterscheidet sich nicht signifikant von LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen (p = 0,16). In den negativen Kontrollzellen (β-Gal) ist die Aufnahme des Liganden im Mittel um 54 % gegenüber der LDL-Rezeptor Überexpression verringert (p < 0,005).





 $3x10^{5}$  CHO-Zellen wurden mit ß-Galaktosidase (ß-Gal), mit LDL-Rezeptor und ß-Galaktosidase (LDL-R), mit LDL-Rezeptor und  $\Delta$ aa8-15 (LDL-R+ $\Delta$ aa8-15), LDL-R und aaTyr $\rightarrow$ Ala (LDL-R+aaTyr $\rightarrow$ Ala) transfiziert. Den Zellen wurden 4-5 µg/ml <sup>125</sup>I-LDL hinzugegeben (± 50fachem Überschuß an kaltem LDL) und der Ligand während einer 1stündigen Inkubation bei 37 °C internalisiert. Die Zellen wurden gemäß Kapitel 3.9.1. behandelt. Die Rezeptor-vermittelte internalisierte Radioaktivität errechnet sich aus Doppelwerten und wird in cpm pro mg Zellprotein angegeben. Sie repräsentiert den Mittelwert (± Standardabweichung) aus vier unabhängigen Experimenten mit dreifachem Probenansatz. Die Mittelwerte werden mit Hilfe des Student t-Test verglichen: p = 0,16 für LDL-R und LDL-R+ $\Delta$ aa8-15, p< 0,05 für LDL-R und LDL-R und LDL-R+aaTyr $\rightarrow$ Ala (\*), p< 0,005 für LDL-R und β-Gal (\*\*).

Aus diesen vorläufigen Ergebnissen ist zu entnehmen, daß der Ersatz der zehnten Aminosäure des N-Terminus Tyrosin durch Alanin und somit der Verlust einer potentiellen Phosphorylierungsstelle den stimulatorischen Effekt des Annexin VI in der Rezeptorvermittelten Aufnahme und Degradation von LDL nicht beeinflußt.

Die Resultate der funktionellen Analyse der Annexin VI-Mutanten sind in Tabelle 4.5. noch einmal schematisch zusammengefasst.

Desweiteren ist sowohl in einem 1stündigen Aufnahme-, als auch in einem 6stündigen Internalisations- und Degradationsexperiment bestätigt worden, daß die Transfektion von CHO-Zellen ausschließlich mit Annexin VI bzw. beliebiger Mutanten Plasmid-DNA die Endocytose von <sup>125</sup>I-LDL im Vergleich zu ß-Galaktosidase überexprimierenden Zellen nicht signifikant beeinflußt. Aufgrund der Korrelation mit vorherigen Studien (Grewal et al., 2000) ist auf weitere Kontrollexperimente verzichtet worden.

<b>Plasmid-DNA</b>	<sup>125</sup> I-LDL	p-Wert	<sup>125</sup> I-LDL	p-Wert
cotransfiziert mit LDL-R	Internalisation		Degradation	
Annexin VI wt	<b>▲</b>	0,00042	<b>≜</b>	0,00551
Δ1-352	<b>▲</b>	_	<b></b>	_
Δ1-175	->	0,83273	-	0,14193
Δaa8-15	→	0,33974	-	0,57697
aa10 Tyr→Ala	♠	_	<b>≜</b>	_

**Tab. 4.5.: Funktionelle Charakterisierung der Annexin VI-Mutanten in der Rezeptor-vermittelten Endocytose von LDL** Zusammenfassend werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Aufnahme-und Degradationsversuche mit <sup>125</sup>I-LDL schematisch dargestellt. Im Vergleich zur LDL-Rezeptor Überexpression führt die Transfektion von CHO-Zellen mit Annexin VI zu einer Stimulation der Internalisation und Degradation von LDL ( $\uparrow$ ). Die C-terminale Deletionsmutante  $\Delta 1$ -352 und die N-terminale Punktmutation aaTyr $\rightarrow$ Ala verhalten sich wie der Wildtyp. Die Transfektion mit  $\Delta 1$ -175 oder mit  $\Delta aa8$ -15 führt zum Verlust des stimulatorischen Effektes ( $\rightarrow$ ). Die Student t-Test p-Werte aus dem Vergleich mit LDL-R transfizierten Zellen sind angegeben. Alle Aussagen gelten lediglich für Coexpressionen mit LDL-Rezeptor.

# 4.4.3. Vergleich der Aufnahme von DiI-LDL in Annexin VI und Annexin II überexprimierenden Zellen

Die Möglichkeit der Studie einzelner transfizierter Zellen bietet die Immunfluoreszenz. Hierzu sind CHO-Zellen mit DiI-markiertem LDL inkubiert worden. DiI ist ein rotfluoreszierendes Phospholipid-Äquivalent.



#### Abb. 4.22.: DiI-LDL-Aufnahme in Annexin VI und Annexin II transfizierten CHO-Zellen

1x10<sup>5</sup> CHO-Zellen wurden auf Silane-beschichteten Cover Slips ausplattiert und mit Annexin VI (A-C) und Annexin II (D) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gekühlt und 30 Minuten bei 4 °C mit DiI-LDL inkubiert. Die Internalisation des Liganden erfolgte für 5 Minuten bei 37 °C. Als primärer Antikörper wurden Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und Maus Anti-Annexin II-Antikörper (H 28) eingesetzt. Diese wurden durch Cy 2(grün)-konjugierten Esel Anti-Kaninchen-Antikörper (A) und Cy 2(grün)-konjugierten Esel Anti-Maus-Antikörper (D) detektiert. Die Signale von Annexin VI (grün) und DiI-LDL (rot) sind in C, von Annexin II (grün) und DiI-LDL (rot) in D übereinanderliegend abgebildet.

In Abb 4.22.A-C ist eine Annexin VI transfizierte Zelle (grün) dargestellt. Deutlich erkennbar zeigt diese Zelle gegenüber den benachbarten nicht-transfizierten CHO-Zellen kein erhöhtes oder verändertes DiI-LDL Aufnahmeverhalten. Dieses entspricht bisherigen Beobachtungen (Grewal et al., 2000).

Das gleiche Ergebnis liefert die Überexpression von Annexin II (Abb 4.22.D). Auch diese Zelle weist im Vergleich zu ihrer Umgebung keine gesteigerte DiI-LDL-Internalisation auf. In allen Zellen ergibt die LDL-Aufnahme ein gleiches Verteilungsmuster gepunkteter DiI-Signale (rot). Ein phänotypischer Vergleich von Annexin VI und Annexin II transfizierten Zellen ist bereits in Kapitel 4.3.6. beschrieben worden.

# 4.4.4. Internalisation von DiI-LDL in Annexin VI und LDL-Rezeptor coexprimierenden Zellen

Zum immunfluoreszenztechnischen Nachweis der Lipoproteinaufnahme in LDL-Rezeptor und Annexin VI transfizierten CHO-Zellen sind diese mit DiI-LDL inkubiert worden. Abb. 4.23.A-C belegt, daß die Expression von LDL-Rezeptor (grün) alleine bereits zu einer massiven Akkumulation von DiI-LDL (rot) in transfizierten Zellen führt, welche in Kernnähe die größte Ausprägung aufweist. Nicht-transfizierte Nachbarzellen sind um ein Vielfaches DiI-signalärmer. Der LDL-Rezeptor (grün) ist teilweise an der Plasmamembran lokalisiert.

Die Coexpression von Annexin VI (grün) und LDL-Rezeptor offenbart ebenfalls eine erhebliche Steigerung der LDL-Aufnahme verglichen mit den benachbarten nicht-trans-

fizierten Zellen (Abb. 4.23.D-F). Das DiI-Signalmuster entspricht dem der LDL-Rezeptor transfizierten Zellen.

Die Überexpression von LDL-Rezeptor bzw. die Coexpression von LDL-Rezeptor und Annexin VI läßt folglich die Aktivität des LDL-Rezeptors in nicht transfizierten Zellen unbeeinflußt. Diese Aussage ist bei der Beurteilung der Ergebnisse der radioaktiven Funktionsanalysen zu berücksichtigen.

Aufgrund der starken Aufnahme von DiI-LDL ist eine quantitative Einschätzung des Verhältnisses der LDL-Aufnahme in ausschließlich LDL-Rezeptor transfizierten und LDL-Rezeptor + Annexin VI cotransfizierten Zellen nicht möglich.



Abb. 4.23.: DiI-LDL-Aufnahme in LDL-Rezeptor und LDL-Rezeptor zusammen mit Annexin VI transfizierten CHO-Zellen Immunfluoreszenzanalyse von 1x10<sup>5</sup> CHO-Zellen, welche auf Silane-beschichteten Cover Slips mit humanem LDL-Rezeptor und ß-Galaktosidase (A-C), bzw. mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (D-F) cotransfiziert wurden. Gemäß Kapitel 3.10.3. wurden die Zellen 24 Stunden später mit DiI-LDL inkubiert (B und E), anschließend fixiert und permeabilisiert. Bei der primären Antikörper-Inkubation wurden Kaninchen Anti-LDL-Rezeptor-Antikörper (A) und Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (D) eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.). Als sekundärer Antikörper wurde Cy 2(grün)-konjugierter Esel Anti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Die Signale von LDL-Rezeptor (grün) und DiI-LDL (rot) sind in C, von Annexin VI (grün) und DiI-LDL (rot) in F superpositioniert abgebildet.

# 4.4.5. Aufnahme von DiI-LDL in Annexin VI-Mutanten und LDL-Rezeptor coexprimierenden Zellen

Um mögliche Unterschiede in der Beeinflussung endocytotischer Aufnahme von LDL zwischen Annexin VI und Annexin VI-Mutanten transfizierten Zellen zu studieren, sind DiI-LDL Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt worden. Abb. 4.24.A-C demonstriert die 5minütige Aufnahme von Rezeptor-gebundenem DiI-LDL in einer LDL- Rezeptor und Annexin VI cotransfizierten CHO-Zelle. Wie in Kapitel 4.4.4. bereits beschrieben führt die Coexpression in diesem experimentellen Ansatz in der Zelle zu einer ausgeprägten Ansammlung von LDL mit starken kernnahen Signalen.

Die Cotransfektion von LDL-Rezeptor und ∆1-352 führt ebenfalls im Vergleich zu den umliegenden Zellen zu einer erhöhten Quantität und Intensität gepunkteter DiI-LDL-Signale (D-F).



#### Abb. 4.24.: DiI-LDL-Aufnahme in LDL-Rezeptor und Annexin VI-Mutanten cotransfizierten CHO-Zellen

 $1x10^5$  CHO-Zellen wurden auf Silane-beschichteten Cover Slips wachsend transfiziert. 24 Stunden nach der Cotransfektion mit LDL-Rezeptor und Annexin VI (A-C), mit LDL-Rezeptor und  $\Delta 1-352$  (D-F), mit LDL-Rezeptor und  $\Delta 1-175$  (G-I), mit LDL-Rezeptor und  $\Delta aa8-15$  (J-L) wurden die Zellen gekühlt und 30 Minuten bei 4 °C mit DiI-LDL inkubiert (B, E, H, K). Einer 5minütigen LDL-Aufnahme bei 37 °C folgte die Fixation und Permeabilisation der Zellen. Der primäre Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) wurde mit Cy2(grün)-konjugiertem Esel Anti-Kaninchen-Antikörper dargestellt (A, D, G, J). Die Signale von Annexin VI bzw. Annexin VI-Mutanten (grün) und DiI-LDL (rot) sind in C, F, I, und L übereinanderliegend dargestellt.

Eine massive Akkumulation von LDL weisen auch LDL-Rezeptor und  $\Delta$ 1-175 coexprimierende Zellen auf (G-I). Ein peripheres Verteilungsmuster von Signalverdichtungen ist in diesen Zellen vielleicht etwas ausgeprägter als in LDL-Rezeptor und Annexin VI cotransfizierten Zellen.

Eine deutliche Abnahme der Anzahl und Intensität roter Fluoreszenzen gegenüber LDL-Rezeptor und Annexin VI transfizierten Zellen resultiert aus der DiI-LDL-Aufnahme in LDL-Rezeptor und Δaa8-15 überexprimierenden CHO-Zellen (J-L).

### **5. DISKUSSION**

### 5.1. Expression von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten

In der vorliegenden Studie wird die Rolle von Annexin VI in endocytotischen Stoffwechselprozessen transfizierter Zellen untersucht. Die Überexpression ist ein etabliertes Verfahren zur Identifikation der Funktion von Proteinen ("gain of function"). Zur Analyse der endocytotischen Rolle erfolgt in dieser Studie die Transfektion mit Ratten Annexin VI Plasmid-DNA: Annexin VI ist in Ratten als Markerprotein hepatischer Endosomen identifiziert worden (Jäckle et al., 1994). Zur Untersuchung spezifischer Überexpressionseffekte bieten sich Studien einer Zellinie an, welche geringe Mengen endogenes Annexin VI exprimiert: Western Blot-Analysen ß-Galaktosidase transfizierter CHO-Zellen bestätigen die Eignung dieser Zellinie für das experimentelle Vorhaben (Kapitel 4.2.1.). Die Aussagekraft dieser Arbeit ist gegenüber anderen Annexin VI-Studien erhöht, welche vornehmlich auf Beobachtungen an isolierten Membranfraktionen oder zellfreien Membranfusionsexperimenten basieren (Gerke u. Moss, 1997).

Der Expressionsnachweis von Annexin VI (Kapitel 4.2.1.) im Western Blot bestätigt ein funktionierendes experimentelles System. Die Immunodetektion des Proteins sowohl mit dem Schaf-Anti-Annexin VI- (AB3718), als auch mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) demonstriert die hohe Spezifität beider Antikörper. Ihre unterschiedlichen Antigenstrukturen (Kapitel 2.1.5.) erlauben einen differenzierten experimentellen Einsatz.

Im Western Blot lassen sich auch die C-terminalen Deletionsmutanten  $\Delta 1$ -641,  $\Delta 1$ -500,  $\Delta 1$ -352 und  $\Delta 1$ -175 analog zum Annexin VI Wildtyp mit beiden Antikörpern detektieren (Kapitel 4.2.3.). Die mutierten Proteine von teilweise geringer Größe sind demnach

exprimierbar. Die Übereinstimmung der Proteingrößen mit den theoretisch errechneten Molekulargewichten (Tab. 4.1.) beweist die Funktionalität des etablierten experimentellen Systems bezüglich Klonierung, Transfektion und Expressionsnachweis. Jedes Konstrukt ist durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft worden.

Die N-terminale Mutante  $\Delta aa8-15$  kann lediglich mit dem Kaninchen Anti-Annexin VI-Antikörper (1CO908) und nicht mit dem Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper (AB3718) nachgewiesen werden. Dieses beruht auf der unterschiedlichen Antigenstruktur beider Antikörper: Während der Kaninchen Antikörper das gesamte Protein erkennt (Ortega et al., 1998), richtet sich der Schaf Antikörper gegen ein synthetisches Peptid der ersten elf N-terminalen Aminosäuren von Annexin VI (Kapitel 2.1.5.). Der Verlust der N-terminalen Aminosäuren acht bis fünfzehn ( $\Delta aa8-15$ ) scheint zu einem Verlust der Bindung des Schaf Anti-Annexin VI-Antikörper zu führen.

### 5.2. Eigenschaften und Lokalisation von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten

### 5.2.1. Intrazelluläre Verteilung von Annexin VI

Die kontrovers diskutierte Lokalisation des Annexin VI ergibt sich aus den Analysen in unterschiedlichen Zelltypen und ist deshalb schwer zu definieren. In dieser Arbeit liefert die Immunfluoreszenz eine plasmamembranöse Konzentration und die feinfleckige Signalverteilung von Annexin VI über die CHO-Zelle (Kapitel 4.3.1.). Eine Bindung an die Plasmamembran wird in diversen Untersuchungen an CHO-Zellen (Grewal, persönliche Mitteilung), Hepatocyten (Tagoe et al., 1994; Weinman et al., 1994), Erythrocyten (Bandorowicz et al., 1992) und Lymphocyten (Owens u. Crumpton, 1984) bestätigt. Bei der Isolation Annexin VI-angereicherter endosomaler Fraktionen aus Ratten-Hepatocyten weist die Plasmamembran jedoch lediglich geringe Mengen des 68 kD-Proteins auf (Jäckle et al., 1994). Dieses könnte auf Entfernung des Annexin VI bei der Homogenisation und Reinigung der Membranen oder einem Verlassen der Plasmamembran bei der Generation von Endosomen beruhen. Aktuelle Studien sprechen für ein dynamisches Verhalten des Annexin VI im Membranverkehr (Grewal et al., 2000), was die unterschiedlichen Beobachtungen der exakten intrazellulären Lokalisierung erklären könnte. Analysen humaner Fibroblasten (Barwise u. Walker, 1996) und glatter Muskelzellen (Babiychuk et al., 1999) demonstrieren eine Kalzium- und Konzentrationsabhängige Translokation des Annexin VI in zellulären Kompartimenten. Der Einsatz einer Vielzahl unterschiedlicher Anti-Annexin VI-Antikörper scheint eine weitere Ursache differierender Literaturdaten sein: Möglicherweise werden jeweils unterschiedliche Isoformen und Konformationen des Annexin VI beschrieben. Der Nachweis von Annexin VI an Membranen hepatischer Endosomen und des Golgi-Apparates (Jäckle et al., 1994), in hepatischen Mitochondrien (Rainteau et al., 1995), am Endoplasmatischen Retikulum (Hazarika et al., 1991) und an cytoskelettalen Aktinfilamenten (Hosoya et al., 1992) spricht für eine weitverbreitete intrazelluläre Lokalisation. Diese geht konform mit den über die CHO-Zelle verteilten Fluoreszenzsignalen dieser Studie (Kapitel 4.3.1.).

Die partielle Colokalisation von Annexin VI mit dem in der Literatur ausführlich charakterisierten Annexin II (Kapitel 4.3.6.) läßt weitere Schlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation zu: Annexin II findet sich in der Zelle plasmamembranös und frühendosomal assoziiert (Thiel et al., 1992). Die Deckungsgleichheit eines Anteils der immunfluoreszensischen Signale beider Proteine in der CHO-Zelle spricht für eine partielle Lokalisation des Annexin VI an der Plasmamembran und in frühen Endosomen. Eine in NRK-Zellen beschriebene vorrangige Lokalisation von Annexin VI im prälysosomalen und lysosomalen Kompartiment (Pons et al, 2000) kann in diesen Untersuchungen an CHO-Zellen nicht bestätigt werden.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz ist die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI mit einem weiteren biochemischen Ansatz untersucht worden: Die Analyse von Membranpräparationen Annexin VI transfizierter CHO-Zellen ergibt eine gegenüber dem Cytosol mehr als sechsfach erhöhte Anreicherung von Annexin VI in der membranösen Fraktion (Kapitel 4.3.2.). Diese Aussage bekräftigt Annexin VI in seiner Eigenschaft als Membran-assoziiertes Phospholipidbindungsprotein (Gerke u. Moss, 1997). Der deutlich geringere cytosolische Anteil des 68 kD-Proteins könnte einen weiteren Funktionszustand widerspiegeln. Die Literatur beschreibt subzelluläre Fraktionierungen, bei denen Annexin VI auch in cytosolischen Fraktionen identifiziert wird (Barel et al., 1991). Neben einer Ablösung von membrangebundenem Protein durch die mechanische Behandlung ist eine Sättigung der Membranen mit Annexin VI ebenfalls nicht auszuschließen: An isolierten Membranen erreicht die Menge an gebundenem Annexin VI bei einer Proteinkonzentration von 1 nM ein Plateau (Kamal et al., 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik erlaubt lediglich die Trennung von Cytosol und Membranfraktionen. Eine Differenzierung von Plasma-, Kern- und Organellmembranen wird nicht vollzogen. Die unterschiedliche Bandenbreite der cytosolischen und membranösen Fraktion in der Immunodetektion könnte auf die massive Protein- bzw. Lipidanreicherung im Pellet zurückgeführt werden. Die Ansammlung cytosolischer Proteine in der entsprechenden Fraktion ist mit dem Nachweis des cytosolischen Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Horecker, 1976; Wood, 1985; Aitken et al., 1994) bestätigt worden. Im Gegensatz dazu ist die Identifikation des LDL-Rezeptors in den membranösen Fraktionen Rezeptor-überexprimierender CHO-Zellen nicht gelungen. Die cytosolische Fraktion wird demnach im Rahmen der biochemischen Behandlung nicht vollständig von membranösen Komponenten gereinigt, sondern beinhaltet vermutlich Membranfragmente (z.B. coated pits).

Zur Differenzierung der Lokalisation von Annexin VI in den unterschiedlichen zellulären Kompartimenten sind initiale Studien zur Auftrennung von Zellfraktionen im Sucrosegradienten durchgeführt worden (Kapitel 4.3.5.). Die Auswertung demonstriert konzentrierte Anreicherungen von Annexin VI in zwei Fraktionen (Fraktion 9 und 12). Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Identifikation von zellulären Kompartimenten in den Fraktionen nicht möglich gewesen. Trotz der Beschreibung von Annexin VI als Membranprotein hepatischer Endosomen in Ratten (Jäckle et al., 1994), kann über eine Prävalenz endosomaler Kompartimente in Fraktion 9 nur spekuliert werden. Spätere Studien veranschaulichen in Endosomenpräparationen eine Anreicherung von Annexin VI in der plasmamembranösen Fraktion und nach induzierter Endocytose in frühen Endosomen (Grewal et al., 2000). In Anbetracht dieser Erkenntnisse und der immunfluoreszensischen Darstellung ist die Signalstärke in Fraktion 9 höchstwahrscheinlich ein Hinweis auf frühendosomal assoziiertes Annexin VI. In der schweren Fraktion 12 dürfte sich das plasmamembranös gebundene Annexin VI wiederfinden. Diese Aussagen sind zunächst jedoch auf CHO-Zellen zu beschränken: Eine spezifische endosomale Anreicherung von Annexin VI kann beispielweise in BHK-Zellen nicht beobachtet werden (Seemann et al., 1996b).

## 5.2.2. Einfluß C-terminaler Deletionen auf die intrazelluläre Lokalisation

Die acht Kerndomänen des Annexin VI besitzen jeweils eine A/B- und eine D/E-Schleife, welche als potentielle Kalziumbindungsstellen fungieren. Die D/E-Schleifen haben jedoch nur eine geringe Kalziumaffinität. Die Kalziumbindung dient als Brücke zur Assoziation des Annexin VI an membranständige Phospholipide (Swairjo et al.,

1995). Die sukzessive C-terminale Deletion führt somit zum allmählichen Verlust der Phospholipidbindungsstellen. In den immunfluoreszensischen Untersuchungen weisen die Mutanten  $\Delta 1$ -641,  $\Delta 1$ -500 und  $\Delta 1$ -352 dasselbe phänotypische Erscheinungsmuster wie der Annexin VI Wildtyp auf (Kapitel 4.3.1.). Die Abwesenheit von einer halben, zwei bzw. vier hochaffinen Kalziumbindungsstellen beeinflußt die intrazelluläre Lokalisation von Annexin VI unter diesen experimentellen Bedingungen nicht. Die Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche Potenz der einzelnen Kalziumbindungsstellen bei der Erhaltung der Lokalisation und der ihr zugrundeliegenden Membranaffinität hin. Obwohl kristallisiertes Annexin VI an den Schleifen III-AB, IV-AB, V-AB, VI-AB, VIII-AB und I-DE Kalzium-Ionen aufweist (Avila-Sakar et al., 1998), genügen in dieser Studie die Domänen I-IV zur Fixierung an der Membran. Im Membranbindungsmechanismus anderer Annexine scheint die Schleife III-AB eine besondere Rolle zu spielen, da ihre Konformation von derer im Kalziumfreien Zustand differiert (Swairjo et al., 1995). Am Annexin VI verändern die Schleifen II-AB und V-AB Kalzium-abhängig ihre Konformation (Avila-Sakar et al., 1998). Den Mutanten  $\Delta$ 1-641,  $\Delta$ 1-500 und  $\Delta$ 1-352 sind die Schleifen II-AB und III-AB erhalten geblieben, was als Erklärung für die vergleichbare intrazelluläre Lokalisation dienen kann. Mit einer leicht veränderten Methodik (Kapitel 3.11.) sind die Mutanten  $\Delta$ 1-641,  $\Delta$ 1-500 und  $\Delta$ 1-352 in der Immunfluoreszenz als zellkernnahe Klumpen darstellbar. Mehrere Kontrollexperimente haben den Verzicht auf Serum bei der Blockade von unspezifischen Bindungsstellen als Ursache identifiziert: Die starke Überexpression von Mutantenprotein könnte zu dessen Aggregation in Lysosomen und der Formierung unlöslicher dreidimensionaler Strukturen führen. Im Serum befindliche Immunglobuline binden maskierend an die fremden Proteinaggregate, wodurch diese dem Annexin VI-Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Die serumfreie Methode detektiert somit zusätzlich Aggregate, während der serumhaltige Ansatz lösliches Annexin VI darstellt.

Die 20 kD Mutante  $\Delta$ 1-175 kann sich der Aggregation aufgrund ihrer geringen Größe entziehen und liefert in beiden methodischen Ansätzen gleiche Ergebnisse. Diese divergieren von dem Erscheinungsbild der genannten C-terminalen Deletionen: Bei der Darstellung der lediglich zwei A/B-Schleifen besitzenden Mutante  $\Delta$ 1-175 verlieren sich die plasmamembranös betonten Fluoreszenzen zugunsten über die Zelle konfluierender Signale. Dieses deutet auf eine Insuffizienz der restlichen zwei Domänen zur Konservierung der intrazellulären Lokalisation des Annexin VI hin. Die Beobachtungen verdeutlichen die Notwendigkeit der Membranpräparationen als weiteren biochemischen Ansatz zur Verifizierung der immunfluoreszensischen Ergebnisse (Kapitel 4.3.2. und 4.3.3.): Analog zum Annexin VI Wildtyp liefern die C-terminalen Deletionsmutanten  $\Delta$ 1-641,  $\Delta$ 1-500 und  $\Delta$ 1-352 sechsfach stärkere Signale in den membranösen Fraktionen als im Cytosol. Bei der Analyse von  $\Delta$ 1-175 nähern sich die Signalintensitäten von Membran und Cytosol einem Verhältnis von 1:1. Die Deletion von sechs Kerndomänen verringert somit die Affinität des Annexin VI zu Membranen. Dieses Ergebnis bestätigt und korreliert mit den Beobachtungen in der Immunfluoreszenz. Literaturdaten bekräftigen die experimentellen Aussagen: Eine C-terminale Deletionsmutante, welche die letzten vier Kerndomänen entbehrt, weist eine zum Annexin VI Wildtyp analoge Membranassoziation in humanen Fibroblasten auf (Kamal et al., 1998). Die Deletion von sechs C-terminalen Domänen führt zum Verlust der Bindungsfähigkeit.

Neben einer kritischen Anzahl gebundener Kalziumionen zur optimalen Membranassoziation könnte dieses Ergebnis eine bedeutende Rolle der deletierten Schleifen III-AB und IV-AB implizieren. Aktuelle Studien bieten eine Erklärung an: Annexin VI besitzt in der Nachbarschaft der Aminosäure 343 (Tryptophan) eine ATP-Bindungsstelle (Bandorowicz-Pikula et al., 1999). Die Assoziation von ATP führt in vitro zu einer Veränderung der Tertiärstruktur von Annexin VI und moduliert die Affinität des Proteins zu Kalzium und Phospholipiden (Bandorowicz-Pikula u. Pikula, 1998; Danieluk et al., 1999a und 1999b). Im Gegensatz zur Mutante  $\Delta$ 1-352 dürfte  $\Delta$ 1-175 die ATP-Bindungsstelle entbehren.

# 5.2.3. Beeinflussung der intrazellulären Lokalisation durch Verlust der Nterminalen Signalsequenz

Diverse Untersuchungen an den Annexinen I und II postulieren eine spezifische Modulation der Aktivität der Kerndomänen durch den variablen N-Terminus. Hiervon eingeschlossen sind Eigenschaften wie Kalziumbindung, Membranassoziation und intrazelluläre Lokalisation. Beispielsweise demonstriert die Überexpression von N-terminal deletiertem Annexin I eine Involvierung der Reste 13-26 in die Spezifizierung der frühendosomalen Lokalisation des Proteins (Seemann et al., 1996b).

Die immunfluoreszensische Untersuchung der internen N-terminalen Deletion ∆aa8-15 in dieser Arbeit läßt keine morphologischen Differenzen zum Annexin VI Wildtyp erkennen (Kapitel 4.3.1.). Der Verlust dieser acht N-terminalen Aminosäuren kann entweder durch andere Regulatoren kompensiert werden oder spielt für die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des Proteins keine Rolle.

Die Analyse der Membranpräparationen von  $\Delta aa8-15$  ergibt eine dem Annexin VI Wildtyp entsprechende, sechsfach erhöhte Signalintensität der membranösen Fraktionen gegenüber dem Cytosol (Kapitel 4.3.2.). Die Deletion der N-terminalen Aminosäuren 8-15 und der Verlust potentieller Phosphorylierungsstellen führt folglich nicht zu einer Erniedrigung der Membranaffinität von Annexin VI. Über eine Förderung des Phospholipidbindungsverhaltens durch N-terminale Deletion ist keine Aussage möglich. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Membranen aufgrund eines hohen Expressionsniveaus mit gebundenem Protein gesättigt sind. Die hohe Intensität der Membransignale von Annexin VI Wildtyp und  $\Delta aa8-15$  lassen außerdem auf einen suboptimalen Meßbereich schließen, der einen quantitativen Vergleich erschwert. Eine Inhibition des Membranbindungsverhaltens durch den N-Terminus wird bei einigen Annexinen beobachtet: In Phospholipidbindungs-Experimenten mit Annexin I und II führt das Entfernen der N-terminalen Domäne zu einer erhöhten Kalzium- bzw. Phospholipidaffinität (Powell u. Glenney, 1987; Ando et al., 1989; Liu et al., 1995).

Zusammenfassend können die Aminosäuren 8-15 nicht als regulatorische Signalsequenz für das Membranbindungs- und Lokalisationsverhalten identifiziert werden. Eine intramolekulare Beeinflussung der Exposition der Kalzium- und Phospholipidbindungsstellen (Andree et al., 1993) durch diese Aminosäuresequenz wird nicht beobachtet. Der Verlust der potentiellen Phosphorylierungsstellen Tyrosin (aa10) und Serin (aa13) hat auf die Membranaffinität und die intrazelluläre Lokalisation anscheinend keinen Einfluß.

## 5.2.4. Kalzium-abhängige Membranbindung

Die Zugehörigkeit des Annexin VI zur Gruppe der Kalzium-abhängigen Phospholipidbindungsproteine ist in diversen Studien belegt worden (Gerke u. Moss, 1997). Die Kalziumbindungsstellen sind bekannt (Avila-Sakar et al., 1998; Liemann u. Huber, 1997; Benz et al., 1996). Ihre Besetzung ist möglicherweise abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration (Avila-Sakar et al., 1998). In der Literatur wird jedoch auch eine Kalzium-unabhängige Membraninteraktion der Annexine beschrieben (Harder et al., 1997; Harder u. Simons, 1997; Jost et al., 1997; Luckcuck et al., 1998): StachelsaumVesikel gebundenes Annexin VI beispielsweise kann unter Behandlung mit EGTA nicht von der Membran entfernt werden (Turpin et al., 1998).

Die Untersuchung des Membranbindungsverhaltens in dieser Studie (Kapitel 4.3.4.) jedoch deutet auf eine Kalziumabhängigkeit hin: EGTA-haltige Lösungen beeinflussen die Verteilung des Annexin VI in den aus Membranpräparationen gewonnenen Proben. Aus zunehmender EGTA-Konzentration resultiert eine vermehrte Anreicherung von Annexin VI im Pellet. Diese erfolgt bereits nach Behandlung mit 1 mM EGTA, wird bei der höchsten eingesetzten EGTA-Molarität von 25 mM aber am deutlichsten. Dennoch kann diese Konzentration nicht das gesamte Annexin VI-Protein des Probenmaterials in das Pellet transferieren. Die Literatur bestätigt die Dissoziation von Membran-gebundenem Annexin bei einer Konzentration von 1 mM EGTA (Swairjo u. Seaton, 1994). An Clathrin-umhüllten Vesikeln gebundenes Annexin VI jedoch dissoziiert trotz Behandlung mit bis zu 5 mM EGTA nicht von der Membran (Turpin et al., 1998). Neben der Möglichkeit eines Kalzium-unabhängigen Bindungsmechanismus kann eine insuffiziente EGTA-Konzentration in der beschriebenen Studie, auch aufgrund der vorliegenden Arbeit, nicht unbedingt ausgeschlossen werden: Die vollständige Dissoziation von Membran-gebundenem Annexin VI erfolgt nach Behandlung hepatischer Endosomen mit 30 bzw. 100 mM EGTA (Jäckle et al., 1994).

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit ist jedoch eingeschränkt: Nach Behandlung der Membranfraktionen mit EGTA und anschließender Ultrazentrifugation wäre Membran-gebundenes Annexin VI entgegen der vorliegenden Ergebnisse im Pellet zu erwarten. Die Dominanz der Überstandsignale als Folge einer Solubilisierung durch die EGTA-Lösungen (EGTA in 1 % Triton X-100, 50 mM Tris und 80 mM NaCl) ist nicht ausgeschlossen.

Theoretisch müssen sich die divergierenden Ergebnisse der Untersuchungen nicht unbedingt widersprechen: Annexin VI könnte zunächst transient Kalzium-vermittelt mit Phospholipiden assoziieren und anschließend eine Kalzium-unabhängige stabilisierende Bindung an weitere Membrankomponenten eingehen (Tagoe et al., 1994).

# 5.3. Rolle von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinen

## 5.3.1. Überexpression von Annexin VI stimuliert die Aufnahme von LDL

In der vorliegenden Studie ist die Rolle von Annexin VI in der Clathrin-abhängigen Lipoproteinaufnahme untersucht worden. In transfizierten CHO-Zellen stimuliert die Überexpression von Annexin VI zusammen mit dem LDL-Rezeptor signifikant die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL (Kapitel 4.4.1.). Dieses bestätigt bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe Jäckle (Grewal et al., 2000). Eine in vorherigen Untersuchungen angegebene Stimulation um 50 % verglichen mit LDL-Rezeptor überexprimierenden Zellen wird jedoch nicht erreicht. Ursache mag eine im Verlauf dieser Studie auffällig hohe Transfektionseffizienz mit LDL-R Plasmid-DNA sein (30 % in der Immunfluoreszenz), welche den Referenzwert erhöht. Die Funktionalität des LDL-Rezeptors in dem experimentellen System wird durch seine Stimulation der LDL-Aufnahme verglichen mit nicht (Kapitel 4.4.4.) bzw. ß-Galaktosidase (Kapitel 4.4.1.) transfizierten Zellen bestätigt. Einige ausreißende Ergebnisse entziehen der Annexin VI-vermittelten Stimulation der einstündigen LDL-Internalisation die Signifikanz. Möglicherweise wird die Analyse aufgrund geringer Transfektionseffizienz und variierender Qualität der präparierten LDL erschwert. Dieses bestätigt die Komplexität des experimentellen Systems.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, daß der stimulatorische Effekt des Annexin VI auf einer direkten Steigerung der LDL-Internalisation beruht: Erstens kann die Stimulation der Lipoproteinaufnahme nicht auf ein verändertes Expressionsniveau des LDL-Rezeptors nach Cotransfektion mit Annexin VI zurückgeführt werden (Kapitel 4.2.2.). Zweitens wird die Aktivität des endogenen LDL-Rezeptors in nicht transfizierten Zellen durch Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor nicht beeinflußt (Kapitel 4.4.4.).

Die Überexpression von Annexin VI alleine (Kapitel 4.4.2. und 4.4.3.) führt zu keiner Änderung der LDL-Internalisationsrate (Grewal et al., 2000). Vermutlich limitiert die geringe Anzahl von LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche den stimulatorischen Effekt. Vergleichbare Beobachtungen sind in Experimenten mit Rab5 gemacht worden, welches lediglich bei Coexpression mit Transferrinrezeptor die Transferrin-Internalisation stimuliert (Stenmark et al., 1994; Bucci et al., 1992). Der fehlende Einfluß von Annexin VI auf die Fluid-Phase-Endocytose der Meerrettich-Peroxidase (Grewal et al., 2000) schließt einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus bei der Steigerung der LDL-Aufnahme aus. Somit dürfte der Effekt des partiell plasmamembranös lokalisierten Annexin VI (Kapitel 4.3.1. und 4.3.6.) auf einer Stimulation der initialen Schritte der Rezeptor-vermittelten Endocytose beruhen. Neben der Anreicherung von Annexin VI in Plasmamembranen (Tagoe et al., 1994) und Endosomen (Jäckle et al., 1994) der Rattenleber, der Colokalisation mit dem frühendosomalen Markerprotein Rab5 (Ortega et al., 1998), unterstützt ebenfalls die enge Assoziation mit Dynamin (Turpin et al., 1998) diese Hypothese. Diese GTPase ist essentiell für die Abschnürung umhüllter Vesikel von der Plasmamembran. Die Vermittlung der Aktivität einer Calpain-ähnlichen Protease beim Umbau des plasmamembranösen Spectrin/Aktin-Cytoskeletts zur Formierung umhüllter Vesikel, weist dem Annexin VI eine spezifische endocytotische Funktion zu (Kamal et al., 1998). Die Komplexität der cytoskelettalen Organisation (Michaely et al., 1994) eine Interaktion mit weiteren Proteinen nicht aus.

Kein weiteres Annexin stimuliert die Ablösung der coated Vesikel von gereinigten Plasmamembranen (Lin et al., 1992). Dementsprechend stimuliert ebenfalls partiell plasmamembranös lokalisiertes Annexin II weder die LDL-, noch die Transferrin-Aufnahme – trotz Coexpression mit dem jeweiligen Rezeptor (Grewal et al., 2000). Entgegen früherer Ergebnisse (Lin et al., 1992) ist Annexin VI jedoch nicht essentiell für die Formierung umhüllter Vesikel: Die Entwicklung eines Annexin VI-unabhängigen, alternativen Mechanismus zur Abschnürung von coated Vesikeln wird beobachtet (Kamal et al., 1998). Möglicherweise wird Annexin VI lediglich bei Spectrin-vermittelten Aufnahmeprozessen benötigt. Dieses könnte erklären, daß Annexin VI keinerlei Einfluß auf die Internalisation von Transferrin in A431 Karzinomzellen hat, welche kein endogenes Annexin VI exprimieren (Smythe et al., 1994). Die endocytotische Aufnahme in A431 Karzinomzellen ist wahrscheinlich eher von Aktinfilamenten als von Spectrin abhängig (Lamaze et al., 1997). In CHO-Zellen hingegen stimuliert Annexin VI die Internalisierung von Transferrin bei Cotransfektion mit dem Transferrinrezeptor (Grewal et al., 2000).

Die endocytotische Funktionalität von Annexin VI scheint nicht nur auf Clathrin-abhängige Internalisation beschränkt zu sein: In SR-BI überexprimierenden BHK-Zellen stimuliert Annexin VI die selektive Aufnahme von Cholesterylester aus HDL<sub>3</sub> via Caveolae (Grewal et al., unveröffentlichte Daten). Aufgrund der Identifikation von Annexin VI und Spectrin in Caveolae könnten dem stimulatorischen Effekt vergleichbare cytoskelettal-modulierende Proteininteraktionen zugrunde liegen.

Die angeführten Ergebnisse implizieren eine wichtige und höchstwahrscheinlich spezifische Rolle des Annexin VI in der Regulation der Rezeptor-vermittelten LDL-Internalisation. Vor dem Hintergrund sich ergänzender Literaturdaten läßt sich die Aussage wohlmöglich auf weitere Liganden erweitern.

## 5.3.2. Überexpression von Annexin VI steigert die Degradation von LDL

Annexin VI findet sich in späten Endosomen von Ratten-Hepatocyten (Jäckle et al., 1994) und vorwiegend prälysosomal in WIF-B Hepatomazellen und NRK Fibroblasten (Pons et al., 2000). Die Assoziation mit diesen Kompartimenten könnte auf eine zusätzliche wichtige Rolle in späten endocytotischen Schritten hindeuten. In der vorliegenden Arbeit führt die Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor in CHO-Zellen unabhängig von der Methodik (Kapitel 3.9.2.) zu einer signifikanten Stimulation der Degradation von LDL (Kapitel 4.4.1.). Die Daten werden durch vorherige Untersuchungen bestätigt (Grewal et al., 2000). Die dort beschriebene Steigerung der Degradation um 70 % wird jedoch möglicherweise aus dem in Kapitel 5.3.1. angeführten Grund nicht erreicht. Die Ergebnisse deuten auf eine Involvierung von Annexin VI in dem intrazellulären Weg der LDL zum lysosomalen Kompartiment und der dortigen Verstoffwechselung hin. Aktuelle Studien könnten dieses Phänomen erklären: Die weite intrazelluläre Verteilung von Annexin VI in CHO-Zellen konzentriert sich nach LDL-Aufnahme auf endosomale Strukturen. Assoziiert mit den LDL-haltigen Vesikeln findet Annexin VI sich später angereichert im prälysosomalen Kompartiment (Grewal et al., 2000). Annexin VI reguliert möglicherweise über Interaktionen mit anderen Strukturen den intrazellulären Verkehr von Liganden. Hierzu könnte es nach Stimulation der Endocytose an der Zelloberfläche an formierten Vesikeln gebunden bleiben. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß cytoplasmatisches Annexin VI abhängig vom Funktionszustand mit den Vesikelmembranen assoziiert. Hierbei könnten noch nicht identifizierte Signalmoleküle (z.B. Kalzium, Liganden, Cytokine) intrazelluläre Speicher von Annexin VI mobilisieren. Die Liganden-induzierte Translokation von Annexin VI korreliert mit Beobachtungen in glatten Muskelzellen, wo sich das Protein, abhängig von Konzentration und Kalzium, auf unterschiedliche zelluläre Kompartimente verteilt (Babiychuk et al., 1999). Obwohl in der vorliegenden Studie eine prälysosomale Anreicherung von Annexin VI in CHO-Zellen nicht beobachtet wird (Kapitel 4.3.1.), widerspricht dieses somit nicht dem nachgewiesenen stimulatorischen Effekt auf die Degradation von LDL (Kapitel 4.4.1.). Eine Aussage über eine immunfluoreszensische Colokalisation von Annexin VI und DiI-LDL beladener Vesikel ist aufgrund der sich überlagernden, sehr starken Signale nicht zuverlässig möglich (Kapitel 4.4.4.).

Neben der Ablösung umhüllter Vesikel von der Plasmamembran regulieren Annexin VI vermittelte Interaktionen mit Spectrin ebenfalls den intrazellulären Transfer von Liganden zu Lysosomen. Die Behandlung von NRK-Zellen mit dem Calpain I-Inhibitor ALLN (N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal) hemmt die Degradation von LDL. Dieses Ergebnis und die partielle Colokalisation von Annexin VI mit Spectrin in der perinukleären Region von NRK-Zellen deuten auf einen Annexin VI vermittelten Umbau des Spectrin/Aktin-Cytoskeletts im späten endocytotischen Kompartiment hin (Pons et al., 2001). Calpain-Proteasen modulieren Interaktionen von Membranen und Cytoskelett, was zu einer für Membranfusionen notwendigen Disorganisation der membranösen Lipidkomposition führt (Sasaki et al., 1984; Sato et al., 1995). Vesikel-gebundene Annexin VI/Calpain-Komplexe könnten somit in die Fusion von Endosomen involviert sein. Diese Mechanismen sind jedoch vom Prozeß der Vesikelablösung an der Zelloberfläche zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse bestärken Annexin VI als einen wichtigen Regulator des intrazellulären Weges von LDL, welches Vesikel-assoziiert über Interaktionen mit anderen Strukturen die Verstoffwechselung der Lipoproteine kontrolliert.

# 5.3.3. Deletion von sechs Kerndomänen führt zum Verlust der stimulatorischen Aktivität von Annexin VI

Die sukzessive C-terminale Deletion von Annexin VI bietet die Möglichkeit, für den stimulatorischen Effekt in der Endocytose bedeutende Kerndomänen zu identifizieren. Analog zur Lokalisation verändert die Deletion von bis zu vier Kerndomänen ( $\Delta$ 1-352) das funktionelle Verhalten von Annexin VI nicht (Kapitel 4.4.2.). Für die Stimulation der initialen endocytotischen Schritte und der intrazellulären Verstoffwechselung von Liganden bedeutsame Strukturen oder Signalsequenzen scheinen nicht deletiert. Die Aussagekraft der auf zwei Experimenten beruhenden Ergebnisse muß jedoch durch weitere Studien erhöht werden. Die bei den immunfluoreszensischen Beobachtungen diskutierte Aggregation von Mutantenprotein dürfte die funktionelle Analyse erschweren (Kapitel 5.2.2.). In der Literatur unterstützt eine  $\Delta 1$ -352 ähnliche Deletionsmutante analog zum Wildtyp die Abschnürung umhüllter Vesikel von Fibroblastenmembranen (Kamal et al., 1998).

In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen führt jedoch die C-terminale Deletion von sechs Domänen zum reproduzierbaren Verlust der Stimulation der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinen durch Annexin VI (Kapitel 4.4.2.). Dieser Effekt läßt sich sowohl im kinetischen Verlauf nach wenigen Minuten, als auch in mehrstündigen Ansätzen herausarbeiten. Wegen eines nicht signifikant stimulatorischen Effekts von Annexin VI in einstündigen Aufnahmeanalysen (Kapitel 5.3.1.) werden diese zur Charakterisierung der Mutante  $\Delta$ 1-175 nicht herangezogen. Grundsätzlich erschwert die zwar signifikante, aber aufgrund der Transfektionseffizienz geringe Stimulation des Wildtyps die Analyse der Mutanten. Die Herausarbeitung von Effekten der Mutantenexpression wird durch eine mögliche Adaptation der Zelle an die veränderte Stoffwechsellage innerhalb 24 Stunden nach Transfektion eingeschränkt.

Der Verlust des stimulatorischen Effektes durch massive C-terminale Deletion von Annexin VI bekräftigt das Protein in seiner Funktion als wichtiger Regulator der Endocytose. In der vorliegenden Arbeit korrelieren die Abnahme der plasmamembranösen Lokalisation (Kapitel 4.3.1.) und der Membranaffinität (Kapitel 4.3.3.) mit den funktionellen Einbußen von  $\Delta$ 1-175 bei der Rezeptor-vermittelten Ligandeninternalisation an der Zelloberfläche. Die Ergebnisse implizieren eine funktionelle Bedeutsamkeit der dritten und /oder vierten Kerndomäne, welche als essentiell für die Konservierung der Lokalisation identifiziert worden sind.

Die Ergebnisse werden in der Literatur bestätigt: Die Mikroinjektion einer Deletionsmutante, welche ebenfalls lediglich zwei Kerndomänen besitzt, führt zu einer deutlichen Reduzierung der LDL-Internalisation in humanen Fibroblasten (Kamal et al., 1998). Dieses wird durch eine Inhibition der Formierung umhüllter Vesikel erklärt: Die mit  $\Delta$ 1-175 vergleichbare Mutante läßt jegliche Aktivität in der Ablösung von coated Vesikeln von fibroblastischen Plasmamembranen vermissen (Kamal et al., 1998). Sie inhibiert zudem die Aktivität des Annexin VI Wildtyps und erweist sich als dominant-negativ. Im Zeitraum der experimentellen Arbeit ist eine zuverlässige Überprüfung der Mutante  $\Delta$ 1-175 auf dominant-negatives Verhalten nicht möglich gewesen. Eine in der Literatur beschriebene Kompensation durch einen alternativen Aufnahmemechanismus (Kamal et al., 1998) wird in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Neben einer fehlenden Stimulation der Internalisation ist die Mutante  $\Delta 1$ -175 nicht in der Lage, die Degradation aufgenommener Lipoproteine zu steigern (Kapitel 4.4.2.). Dieses Ergebnis wird durch Studien anderer Arbeitsgruppen unterstützt: Mikroinjektion von sechs Kerndomänen entbehrenden Annexin VI-Mutanten in humanen Fibroblasten (Kamal et al., 1998) und Überexpression in NRK-Zellen (Pons et al., 2001) inhibiert die Degradation von LDL.

Die beschriebenen Phänomene lassen sich folgendermaßen erklären: Annexin VI vermittelt seine endocytotische Funktion wahrscheinlich über Proteininteraktionen. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen hierbei für eine Bedeutung der C-terminalen Annexin VI Region. Die Funktion der Domänen III und IV als Interaktionspartner mit dem Annexin VI N-Terminus (Gerke u. Moss, 1997) oder mit cytoskelettalen Komponenten wie Spectrin (Watanabe et al., 1994) bzw. Aktin (Hayashi et al., 1989) ist nicht auszuschließen. Neben der Inhibition der Formierung umhüllter Vesikel an der Zelloberfläche (Kamal et al., 1998) könnten die fehlenden Proteininteraktionen auch eine Zuführung von Liganden zu Lysosomen bloc??kieren (Grewal et al., 2000; Pons et al., 2001). Fehlende cytoskelettale Umbauprozesse könnten einen Vesikeltransport zum Zellzentrum beeinträchtigen: Spectrin steht über Dynactin mit mikrotubulär-assoziiertem Dynein in Verbindung (Holleran et al., 1996). Die Mikroinjektion einer dominant-negativen Mutante in Fibroblasten führt zur Mislokalisation LDL-positiver Vesikel (Kamal et al., 1998), was die oben angeführten Überlegungen unterstützt. In der vorliegenden Arbeit ist eine Mislokation bzw. periphere Verteilung DiI-LDL-haltiger Vesikel in  $\Delta$ 1-175/LDL-Rezeptor coexprimierenden Zellen nicht eindeutig zu beurteilen und bleibt spekulativ (Kapitel 4.4.4. und 4.4.5.). Die Morphologie dieser LDL-haltigen Vesikel ist ebenfalls schwer zu definieren. Die hohe DiI-Signalintensität in der Zelle könnte jedoch für große LDL-reiche Vesikel sprechen (Pons et al., 2001). Dieses könnte auf eine mangelnde Zuführung von LDL zu Lysosomen und einer Anreicherung der Lipoproteine in endosomalen Kompartimenten hindeuten. Ursächlich ist eine gestörte Annexin VI Funktion in endosomalen Membranfusionsprozessen in Betracht zu ziehen. Durch Verlust von sechs C-terminalen Kerndomänen könnte dem Protein ein wichtiges strukturelles Werkzeug zur Adaptation an Akzeptormembranen fehlen. Der Besitz zweier annähernd identischer Kernhälften mit dynamischer Verbindung befähigt Annexin VI, den Kontakt zweier Membranen zu vermitteln (Liemann u. Huber, 1997). Dieses impliziert eine große Bedeutung in der Membranfusion und Vesikelaggregation (Zaks u. Creutz, 1991).

Möglicherweise verwehrt der Verlust von sechs hochaffinen Kalziumbindungsstellen auch die Transformation des Proteins in seinen funktionell aktiven Zustand.

Neben dem Verlust entscheidender Phospholipidbindungsstellen könnte dieses die mangelnde Bindung der Mutante  $\Delta 1$ -175 an Vesikelmembranen erklären. Die Assoziation von Annexin VI mit endocytotischen Vesikeln scheint jedoch seiner regulatorischen Aktivität im intrazellulären Membranverkehr zugrunde zu liegen (Grewal et al., 2000).

# 5.3.4. Potentielle Rolle des N-Terminus von Annexin VI bei der Endocytose von Lipoproteinen

Aufgrund der konservierten Kernstruktur der Annexine wird vielfach über die Vermittlung der funktionellen Spezifität durch die variable N-terminale Domäne spekuliert (Crompton et al., 1988). Für die Annexine I, II und V ist die regulatorische Wichtigkeit dieses Anteils für die funktionelle Individualität bereits erarbeitet worden (Powell u. Glenney, 1987; Ando et al., 1989; Andree et al., 1993; Wang u. Creutz, 1994). Um eine potentielle Modulation der Aktivität der Kerndomänen durch den N-Terminus von Annexin VI zu prüfen, wird in dieser Arbeit der Effekt der N-terminalen Deletionsmutante ∆aa8-15 auf die Endocytose von Lipoproteinen untersucht (Kapitel 4.4.2.). In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen kann diese Mutante weder die Internalisation noch die Degradation von LDL signifikant stimulieren: Durch interne Deletion der Aminosäuren acht bis fünfzehn verliert Annexin VI seine höchstwahrscheinlich spezifische endocytotische Funktion. Dieses geht nicht mit einer Beeinflussung der Lokalisation (Kapitel 4.3.1.) und der Membranaffinität (Kapitel 4.3.2.) einher und weist auf einen von der Mutante A1-175 differierenden Mechanismus der Funktionsdefizienz hin. Die immunfluoreszensische Analyse der DiI-LDL-Aufnahme weist in ∆aa8-15/LDL-Rezeptor transfizierten Zellen deutlich weniger aufgenommenes Lipoprotein nach als in Annexin VI/LDL-Rezeptor coexprimierenden (Kapitel 4.4.5.). Dieses Ergebnis korreliert mit den radioaktiven Daten. Die Aussagekraft dieser Methode ist jedoch eingeschränkt: In einer anderen Versuchsreihe ist ein quantitativer Unterschied der LDL-Internalisation in lediglich LDL-Rezeptor und Annexin VI/LDL-Rezeptor transfizierten Zellen aufgrund hoher Signalintensität nicht zu erarbeiten (Kapitel 4.4.4.).

Die Untersuchung schließt bei vollständig erhaltenem Proteinkern der Mutante ∆aa8-15 eine primäre funktionelle Spezifität der konservierten Region des Annexin VI aus. Die Aminosäuren acht bis fünfzehn scheinen Signalsequenzen zu bilden oder zu beinhalten, welche die endocytotische Funktionalität des Proteins regulieren. Die N-Termini einiger Annexine (Annexin I, II) enthalten Bindungsstellen für zelluläre Proteinliganden (S100 Proteine) von funktioneller Bedeutung (Tokumitsu et al., 1992; Mailliard et al., 1996; Glenney u. Tack, 1985; Filipek et al., 1991; Bianchi et al., 1992). Möglicherweise ist dem N-Terminus von Δaa8-15 eine ähnliche Bindungssequenz noch nicht identifizierter Liganden genommen. Für das Annexin VI sind kürzlich die S100A1 und S100B-Proteine als Interaktionspartner nachgewiesen worden (Garbuglia et al., 1998). Die Unfähigkeit, unter N-terminaler Vermittlung Liganden-Bindungsstellen am Proteinkern zu exponieren, wäre ebenfalls in Erwägung zu ziehen.

Die vorliegende Untersuchung legt eine funktionell regulierende Bedeutung des N-Terminus von Annexin VI nahe. Seine determinierende Rolle wird durch die fehlende endocytotische Stimulation von Annexin II unterstrichen (Grewal et al., 2000). Dieses Protein, welches in der Immunfluoreszenz partiell mit Annexin VI colokalisiert (Kapitel 4.3.6.) und eine hohe Homologie in der konservierten Region aufweist, scheint in seiner Funktion von Annexin VI zu differieren. Ein interessanter Ansatz zur Charakterisierung der Spezifität des N-terminalen Anteils wäre die Fusion dieser Domäne von Annexin VI mit den Proteinkernen anderer Annexine und vice versa. Möglicherweise werden somit Eigenschaften des Annexin VI auf andere Proteine transferiert.

Die Analyse der Mutante  $\Delta$ aa8-15 könnte auf eine Beteiligung des N-Terminus an signaltransduktiven Prozessen bei der Stimulation der Endocytose hindeuten. Neben einer Sequenzdivergenz weisen die N-terminalen Domänen der Annexine potentielle Stellen zur Phosphorylierung und anderweitiger post-translationaler Modifikation auf. Die reversible Proteinphosphorylierung hat eine zentrale Bedeutung in der Kontrolle einer Reihe essentieller zellulärer Aktivitäten. In der Literatur werden die Annexine I (Fava u. Cohen, 1984; Pepinski u. Sinclair, 1986; Huang et al., 1986) und II (Martinez et al., 1982; Cooper et Hunter, 1983; Greenberg u. Edelman, 1983) als Substrate von Tyrosin-, Serin- und Threoninkinasen beschrieben. Ihre Phosphorylierungsstellen sind fast ausnahmslos N-terminal identifiziert worden (Glenney u. Tack, 1985; De et al., 1986; Gould et al., 1986; Varticovski et al., 1988; Schlaepfer u. Haigler, 1988; Rothhut, 1997). Interaktionen der Annexine I und II mit den Proteinkinasen C und A implizieren eine signaltransduktive Bedeutung. Zahlreiche Studien verdeutlichen eine Phosphorylierungsabhängige Funktionsmodulation von Annexin I und II (De et al., 1986; Brambilla et al., 1991; Futter et al., 1993) – auch in intrazellulären Vesikelaggregations- und

Membranfusionsprozessen (Schlaepfer u. Haigler, 1987; Johnstone et al., 1992; Wang u. Creutz, 1994).

Potentielle Phosphorylierungsstellen des N-terminalen Anteils von Annexin VI sind Tyrosin als zehnte und Serin als dreizehnte Aminosäure, welche beide der Mutante Δaa8-15 fehlen (Kapitel 8.2.). Dieses könnte den Verlust des fördernden Effekts auf die Aufnahme und Verstoffwechselung von LDL erklären. Eine Modifikation von Annexin VI durch Phosphorylierung ist bereits beobachtet worden (Moss et al., 1992), eine Aminosäure-spezifische Zuordnung ist jedoch noch nicht gelungen. Der Funktionsverlust von Annexin VI durch Deletion der Tyrosin und Serin beinhaltenden Sequenz spricht für eine Phosphorylierungs-gesteuerte Funktionalität des Proteins.

Im Hinblick auf eine Identifikation funktionell bedeutender Phosphorylierungsstellen im N-Terminus ist die zehnte Aminosäure Tyrosin initial mit Hilfe der Punktmutation aaTyr→Ala analysiert worden. Im Gegensatz zu ∆aa8-15 stimuliert diese Mutante die Endocytose von LDL (Kapitel 4.4.2). Die Steigerung der einstündigen Lipoproteininternalisation ist signifikant, während die Ergebnisse der beiden sechsstündigen Aufnahmeund Degradationsexperimente der Bestätigung weiterer Untersuchungsreihen bedürfen. Die Korrektheit der Punktmutation ist bei Wildtyp entsprechendem Verhalten durch Sequenzierung überprüft worden. Der Verlust der potentiellen Phosphorylierungsstelle Tyrosin läßt das endocytotische Verhalten von Annexin VI unbeeinflußt. Neben einer Phosphorylierungs-unabhängigen Funktionalität könnte dieses Ergebnis für eine endocytotische Bedeutung der dreizehnten Aminosäure Serin sprechen. Serin<sup>13</sup> versteckt sich in einer Tasche aus Resten der Domäne IV (Avila-Sakar et al., 1998). Durch Phosphorylierung könnte diese Aminosäure konformational auftauchen und das Protein in einen aktiven Zustand transformieren. Die Assoziation von Annexin VI mit der Serin/Threonin-Proteinkinase Ca wird beschrieben, wobei aber eine phosphorylierende Interaktion nicht beobachtet wird (Schmitz-Pfeiffer et al., 1998).

Eine Aussage über eine funktionelle Aktivierung des Annexin VI in endocytotischen Prozessen durch Serinkinasen wäre mit der Analyse eines punktmutativen Ersatzes der dreizehnten Aminosäure möglich. Ebenfalls neue Erkenntnisse könnte wohlmöglich der Austausch einer potentiellen N-terminalen Phosphorylierungsstelle durch einen Glutamatrest liefern. Aufgrund der stabilen negativen Ladung könnte dieser die Anwesenheit eines Phosphates vortäuschen.

97

Diskussion

## 5.4. Mögliche pathophysiologische Relevanz der Annexine

### 5.4.1. Eventuelle pathogene Beeinflussung des Lipoproteinstoffwechsels

Diese Studie postuliert eine Bedeutung des Annexin VI in einem der grundlegendsten Prozesse des menschlichen Organismus - der Endocytose. Defekte der Endocytose werden oftmals mit der Auslösung schwerer Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus, neurodegenerative Störungen und Arteriosklerose in Verbindung gebracht. Letztere ist aufgrund des möglichen Zusammenhangs mit der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse. Gendefekte von Annexin VI als intrazellulär sortierendes Protein könnten von höchster klinischer Relevanz sein - abhängig von Ort und Charakter der mutativen Veränderung (Kapitel 5.3.3. und 5.3.4.). Folgende Beispiele sollen dieses verdeutlichen: Die familiäre Hypercholesterinämie (FH) geht einher mit erhöhten LDL-Plasmawerten und resultiert in einem signifikant gesteigerten Arteriosklerose-Risiko (Goldstein et al., 1995). Die gestörte Fähigkeit, LDL aus der Plasmazirkulation in die Zelle aufzunehmen, gründet in erblichen Mutationen des LDL-Rezeptor-Genes oder seltener des Genes für ApoB, dem Liganden des LDL-Rezeptors (Sun et al., 1997 und 1998). Es werden jedoch auch Patienten mit phänotypisch homozygoter familiärer Hypercholesterinämie beschrieben, die keinen dieser Gendefekte aufweisen (Norman et al., 1999). Der LDL-Rezeptor wird bei diesen Patienten an der Zelloberfläche exprimiert und bindet regulär LDL. Der Rezeptor/Ligand-Komplex kann aber nicht über die Rezeptor-vermittelte Endocytose in das Zellinnere aufgenommen werden. Dieses könnte auf einen Defekt eines möglicherweise LDL-Rezeptor-spezifischen Adaptoren oder anderer endocytotischer Regulatoren hindeuten.

Ein frühes Ereignis in der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen ist die Transformation von Gewebemakrophagen in Cholesterolester-beladene Schaumzellen. Diese resultiert aus einer exzessiven Cholesterolaufnahme via Lipoproteine bzw. deren Derivate (Brown u. Goldstein, 1983; Tabas, 1995). Den Makrophagen stehen lediglich zwei Mechanismen zur Verfügung, das internalisierte Cholesterol zu beseitigen: Die Konvertierung des Cholesterols in eine wasserlöslichere Form via Cholesterol 27-Hydroxylase (Bjorkhem et al., 1994) oder der Cholesterol-Efflux an extrazelluläre Cholesterolakzeptoren (Von Eckardstein, 1996). Der cAMP-abhängige Cholesterol-Efflux an ApoA-I als Apolipoproteinakzeptor ist assoziiert mit der Bindung von ApoA-I in coated pits (Takahashi u. Smith, 1999). Die anschließende zelluläre Internalisation und Resekretion von ApoA-I erfolgt Kalzium-abhängig. Andere Modelle beschreiben eine Reinternalisierung von Cholesterol über SR-BI via Caveolae (Chen et al., 2000). Eine Involvierung von Annexin VI in diesen Prozessen wird nicht ausgeschlossen. Ein genetischer Annexin VI-Defekt könnte somit die Akkumulation von Cholesterolestern in Schaumzellen beeinflussen.

Die Beispiele verdeutlichen, daß eine Beteiligung von Annexin VI in der Pathophysiologie des Lipoproteinstoffwechsels nicht primär ausgeschlossen werden sollte. Zahlreichen Proteinen konnte bereits anhand Untersuchungen von Störungen des Lipoproteinmetabolismus eine Funktion zugewiesen werden – wie z.B. den COP-Proteinen (Guo et al., 1994). Der weiteren Studie der Rolle von Annexin VI in der Endocytose von Lipoproteinen ist somit das Potential eines klinischen Nutzens nicht abzusprechen.

### 5.4.2. Annexine und abgeleitete Krankheitsbilder

Die konservierte Struktur der Annexine und ihre Anwesenheit in zahlreichen Zelltypen läßt auf eine große biologische Bedeutung dieser Proteinfamilie schließen. Eine Eigenschaft als wichtiger physiologischer Mediator impliziert jedoch auch eine hohe pathophysiologische Relevanz. Abnormitäten in der Expression von Annexinen werden bereits mit zwei klinischen Krankheitsbildern assoziiert:

Annexin II findet sich als Bindungsstelle für Plasminogen und tPA (tissue plasminogen activator) auf der Oberfläche von Endothelzellen (Hajjar et al., 1994; Cesarman et al., 1994). Kürzlich ist die Involvierung des Proteins in die Blutgerinnungsstörung einer Patientengruppe mit akuter promyelocytischer Leukämie (APL) demonstriert worden (Menell et al., 1999). Diese Patienten exprimieren abnorm erhöhte Mengen an Annexin II, welche mit dem Niveau der Plasminbildung korrelieren. Hieraus resultiert eine exzessive Fibrinolyse, die in einer nicht-fibrinolytischen APL Zellinie durch Expression von Annexin II induzierbar und durch Anti-Annexin II-Antikörper inhibierbar ist.

Die Plazentae von Patientinnen mit einem Antiphospholipid-Antikörper Syndrom sind defizient an Annexin V (Rand et al., 1994) – ebenso wie mit Antiphospholipid-Antikörpern behandelte Trophoblastenkulturen und Endothelzellen (Rand et al., 1997). Annexin V blockiert durch Bindung an anionische Phospholipide Phospholipid-abhängige Koagulationsreaktionen. Die Anwesenheit Annexin V-spezifischer Antikörper fördert beim Anti-Phospholipid-Antikörper Syndrom koagulatorische Prozesse. Diese Thromboseneigung erhöht das Risiko des spontanen Abortes. Über eine pathogenetische Bedeutung der Annexine in weiteren bekannten Krankheitsprozessen darf spekuliert werden: Die Sekretion von Insulin in  $\beta$ -Zellen des Pankreas geht einher mit der Translokation von Annexin I an Insulin-haltige Vesikel (Ohnishi et al., 1995). Annexin V ist über Interaktion mit Kollagen II und X an der Kalzifizierung von Knorpel beteiligt (Von der Mark u. Mollenhauer, 1997).

Die Partizipation der Annexine an Zellwachstum, -proliferation und -adhäsion weckt Interesse an einer möglichen Involvierung in der Tumorpathogenese, welches in zahlreichen Studien genährt wird. Ein hohes Expressionsniveau von Annexin II findet sich in Zellen des Pankreaskarzinoms (Kumble et al., 1992; Vishwanatha et al., 1993), des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Cole et al., 1992) und hochgradiger Gliome (Reeves et al., 1992; Roseman et al., 1994). Annexin VIII wird in Zellen der akuten myeloischen Leukämie (APL) überexprimiert (Chang et al., 1992; Sarkar et al., 1994). Annexin I induziert die Differenzierung von histiocytischen Lymphomzellen U937 (Hattori et al., 1983) und von bronchialen Adenokarzinomzellen A549 (Croxtall u. Flower, 1992; Croxtall et al., 1993). Annexine können möglicherweise die Genese bestimmter Tumorarten beeinflussen. Tumorsuppressive Effekte werden für Annexin VI beschrieben: Nach Transfektion von Annexin VI in A431 Karzinomzellen stoppt deren Proliferation nach Konfluenz (Theobald et al., 1994). Aus ihnen entstehen in Mäusen kleinere Tumoren als aus nicht-transfizierten Zellen (Theobald et al., 1995). Die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes ist derzeit rein spekulativ.

Annexine werden auch als potentielle Antigene in Autoimmunerkrankungen beschrieben: Autoantikörper gegen Annexin I finden sich bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis (Hirata et al., 1981; Goulding et al., 1989). Die Bildung von Autoantikörpern gegen Annexin I erfolgt auch im Zuge chronischer Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Stevens et al., 1993).

Pathophysiologisch bedeutsam präsentiert sich die Eigenschaft der Annexine als Ionenkanal-Regulatoren: Die Überexpression von Annexin VI im Herzen transgener Mäuse führt zu zahlreichen kardialen Problemen (Gunteski-Hamblin et al., 1996). Die Mäuse mit dem höchsten Expressionsniveau versterben kurz nach der Geburt an Herzversagen. Dem zugrunde liegt wahrscheinlich eine Suppression der Kalziummobilisation durch Annexin VI. Einigen Annexinen wird eine Beteiligung am ventrikulären Remodelling und an der Kalziumregulation am insuffizienten Herzen zugesprochen (Benevolensky et al., 2000; Matteo u. Moravec, 2000). Nicht zuletzt wegen der Involvierung von Annexin IV in die Steuerung von Chloridkanalaktivitäten (Kaetzel et al., 1994a; Chan et al., 1994) ist ein therapeutischer Ansatz für Krankheitsbilder wie die zystische Fibrose durch Identifikation weiterer Annexin-abhängiger Kanalregulationen nicht ausgeschlossen.

Zusammenfassend ist den Annexinen eine klinische Relevanz nicht abzuschreiben. Die intensive Erforschung dieser Phospholipidbindenden Proteine mag eines Tages zur Beschreibung einer neuen Klasse von Krankheiten bzw. zum Verständnis bereits bekannter Krankheitsbilder beitragen.

### 5.5. Ausblick

### 5.5.1. Identifikation Annexin VI-bindender Proteine

Die vorliegende Arbeit identifiziert die Kerndomänen 3 und 4 und die N-terminalen Aminosäuren 8 bis 15 als essentiell für den stimulatorischen Effekt von Annexin VI in der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Lipoproteinen. Diese Regionen bieten sich somit als mögliche Strukturen für endocytotisch beeinflussende Proteininteraktionen an. Sie sind näher zu kartieren und zu charakterisieren. Potentielle Interaktionspartner wie Spectrin, Dynamin, Aktin und S100-Proteine sind zu ermitteln, und ihre Bindung an Annexin VI zu bestätigen. Hierbei könnte die Analyse von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten in der Immunpräzipitation mit anschließendem Nachweis von Bindungsproteinen im Präzipitat behilflich sein. Alternativ wäre der Einsatz einer Anti-Annexin VI Affinitätssäule oder von GST-pull-downs zu erwägen.

### 5.5.2. Funktionelle Untersuchungen am Tiermodell

Trotz einer immensen Anzahl von Studien basiert ein Großteil der Annexin-Forschung immer noch auf Spekulationen und Hypothesen. Zahlreiche in vitro Untersuchungen postulieren eine unüberschaubare Anzahl meist überlappender Funktionen der Annexine. Aufgrund der Komplexität und eingeschränkten Aussagekraft der in vitro-Systeme bedarf es der Analyse des Annexin VI in vivo, um sich ein spezifischeres Bild über dessen biologische Eigenschaften zu machen. Untersuchungen an Annexin VI-knock out und transgenen Mäusen könnten die zahlreichen funktionellen Theorien überprüfen und die Aussagen zellbiologischer Daten deutlich erweitern. Der Vergleich des Lipoproteinstoffwechsels von Wildtyp mit Annexin VI-knock out Mäusen könnte nützliche Hin-
weise über eine Beeinflussung der Endocytose in vivo geben. Erste Untersuchungen an Annexin VI-knock out Mäusen werden in der Literatur bereits beschrieben (Hawkins et al., 1999). Die subsequente funktionelle Analyse der Annexin VI-Mutanten am Tiermodell könnte detailliertere Informationen über den Mechanismus und die Funktion von Annexin VI in der Endocytose liefern. Denkbar wäre eine adenovirale Infektion von Mäusen mit dem Ziel der Annexin VI bzw. Annexin VI-Mutanten-Überexpression in der Leber. Der Einfluß von Annexin VI auf den Lipoproteinstoffwechsel könnte somit leberspezifisch untersucht werden.

#### 5.5.3. Genomanalysen

Die Kartierung sämtlicher humaner Annexin Gene ist kürzlich vervollständigt worden und in der "Genome DataBase" der John Hopkins Universität, Baltimore, Maryland erhältlich. Das humane Annexin VI Gen lokalisiert auf dem Abschnitt 5q32-q34 des langen Armes von Chromosom 5 (Davies et al., 1989). Die Primärstruktur des humanen 68 kD Proteins ist sequenziert (Crompton et al., 1988). Mit dem Wissen der genetischen Daten von Annexin VI sollten in naher Zukunft Genomanalysen einen weiteren Einblick in die biologische Funktion, klinische Relevanz und die Beteiligung dieses Proteins an hereditären Anomalien ermöglichen. Derzeit sind weder funktionelle Assoziationen von Annexin Genen und benachbarten Loci bekannt, noch ist eine Genotyp/Phänotyp-Beziehung von Annexin VI ermittelt worden. Einzige Ausnahme ist das autosomal dominante Treacher Collins Syndrom: Das Annexin VI-Gen liegt in der kritischen Region dieser kraniofaszialen Entwicklungsstörung, welche mit Gehörverlust einhergeht (Dixon et al., 1994). Möglicherweise kann die genomanalytische Suche nach Annexin VI-Polymorphismen eines Tages mutative Defekte des Annexin VI-Genes bzw. seiner Regulatoren spezifischen Krankheitsbildern zuordnen. Das Beispiel der familiären Hypercholesterinämie mit zahlreichen Hinweisen auf einen noch unbekannten, LDL-Rezeptor- bzw. ApoB-Gen unabhängigen Defekt (Feher et al., 1993; Schmidt et al., 1998; Haddad et al., 1999; Norman et al., 1999), könnte diese Hypothese bestätigen.

#### 6. ZUSAMMENFASSUNG

Annexin VI ist ein Markerprotein hepatischer Endosomen. Es spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Rezeptor-vermittelten Endocytose und des endosomalen Membranverkehrs. In dieser Studie wurde anhand der Überexpression von Annexin VI und Annexin VI-Mutanten die mögliche Rolle des Proteins in der Aufnahme und Verstoffwechselung von LDL untersucht. Biochemische und immunfluoreszensische Lokalisationsstudien deuten auf eine Assoziation von Annexin VI mit der Plasmamembran und frühen Endosomen in CHO-Zellen hin. Die Überexpression von Annexin VI alleine führt in CHO-Zellen zu keiner Beeinflussung der Endocytose und Degradation von LDL. Jedoch liefert die Coexpression von Annexin VI und LDL-Rezeptor eine Stimulation der LDL-Internalisation um 25 % und der Degradation um 23 % verglichen mit Zellen, in denen der LDL-Rezeptor allein überexprimiert ist. Die suk-C-terminale zessive Deletion bis vier Kalziumvon zu und Phospholipidbindungsdomänen von Annexin VI führt zu keiner Beeinflussung der Lokalisation oder des funktionellen Verhaltens. Das Fehlen von sechs Repeats jedoch geht einher mit einer stark verringerten Membranaffinität und führt zum Verlust des stimulatorischen Effektes auf die LDL-Rezeptor-vermittelte Endocytose von Lipoproteinen. Im Gegensatz dazu resultiert die N-terminale Deletion der Aminosäuren 8 bis 15 zwar nicht in einer veränderten Lokalisation von Annexin VI - jedoch läßt diese Mutante eine Stimulation der Aufnahme und Degradation von LDL vermissen. Neben der Membranbindung scheint somit auch eine Beteiligung des N-Terminus an signaltransduktiven Prozessen eine Rolle bei der Stimulation der Endocytose zu spielen. Die vorliegende Arbeit demonstriert eine entscheidende Rolle von Annexin VI in der Regulation der LDL-Aufnahme und Degradation. Der stimulierende Effekt des Proteins auf die Endocytose korreliert mit seiner intrazellulären Lokalisation, der Membranaffinität und der N-terminalen Signalsequenz. Da der Austausch eines Tyrosinrestes dieser Signalsequenz keinen negativen Einfluß auf die stimulative Wirkung von Annexin VI hat, müssen wohl andere Aminosäuren des N-Terminus für die Übertragung von Signalen verantwortlich sein. Diese Arbeit deutet zudem auf eine grundlegende Bedeutung der dritten und vierten Bindungsdomäne für die endocytotische Funktion von Annexin VI hin. Zukünftigen Studien obliegt die Kartierung essentieller Aminosäuren und die Identifikation Annexin VI-bindender Proteine, welche an der Stimulation der Endocytose beteiligt sind.

# 7. LITERATURVERZEICHNIS

Achiriloaie M, Barylko B, Albanesi JP (1999) Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. Mol Cell Biol 19:1410-1415

Acton S, Rigotti A, Landschultz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271:518-520

Ahle S, Ungewickell E (1989) Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. J Biol Chem 264:20089-20093

Ahle S, Mann A, Eichelsbacher U, Ungewickell E (1988) Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. EMBO J 7:919-929

Aitken J, Krausz C, Buckingham D (1994) Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leucocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. Mol Reprod Dev 39:268-279

Ali SM, Geisow MJ, Burgoyne RD (1989) A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. Nature 340:313-315

Anderson HA, Chen YZ, Norkin LC (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. Mol Biol Cell 7:1825-1834

Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. Annu Rev Biochem 67:199-225

Anderson RGW, Brown MS, Goldstein JL (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. Cell 10:351-364

Anderson RGW, Brown MS, Beisiegel U, Goldstein JL (1982) Surface distribution and recycling of the LDL receptor as visualized by anti-receptor antibody. J Cell Biol 93:523-531

Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by ca-veolae. Science 255:410-411

Ando Y, Imamura S, Hong YM, Owada MK, Kakunaga T, Kannagi R (1989) Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analysed by phospholipid affinity column chromatography. J Biol Chem 264:6948-6955

Ando Y, Imamura S, Owada MK, Kannagi R (1991) Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Augmentation by membrane phospholipids. J Biol Chem 266:1101-1108

Andree HAM, Willems GE, Hauptmann R, Maurer-Fogy I, Stuart MCA, Hermens WT, Frederik PM, Reutelingsperger CPM (1993) Aggregation of phospholipid vesicles by a chimeric protein with the N-terminus of annexin I and the core of annexin V. Biochemistry 32:4634-4640

Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J (1996) An endosomal  $\beta$ -COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. J Cell Biol 133:29-41

Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH (1998) Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. Biochim Biophy Acta 1387:103-116

Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RGW, Xu S, Krieger M (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acetylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. J Biol Chem 272:13242-13249

Babiychuk EB, Palstra RJTS, Schaller J, Kämpfer U, Draeger A (1999) Annexin VI participates in the formation of a reversible, membrane-cytoskeleton complex in smooth muscle cells. J Biol Chem 274:35191-35195

Bandorowicz J, Pikula S, Sobota A (1992) Annexins IV (p32) and VI (p68) interact with erythrocyte membrane in a calciumdependent manner. Biochim Biophys Acta 1105:201-206

Bandorowicz-Pikula J, Pikula S (1998) Modulation of annexin VI-driven aggregation of phosphatidylserine liposomes by ATP. Biochimie 80:613-620

Bandorowicz-Pikula J, Wrzosek A, Danieluk M, Pikula S, Buchet R (1999) ATP-binding site of annexin VI characterized by photochemical release of nucleotide and infrared difference spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun 263:775-779

Barel M, Gauffre A, Lyamani F, Fiandino A, Hermann J, Frade R (1991) Intracellular interaction of EBV/C3d receptor (CR2) with p68,a calcium-binding protein present in normal but not in transformed B lymphocytes. J Immunol 147:1286-1291

Barter P (1993) High-density lipoproteins and reverse cholesterol transport. Curr Opin Lipidol 4/3:210-217

Barter PJ, Hopkins GJ, Calvert GD (1982) Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. Biochem J 208:1-7

Barwise JL, Walker JH (1996) Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts. J Cell Sci 109:247-255

Battey FD, Grafvels ME, Fitzgerald DJ, Argraves WS, Chappel DA, Strauss JF, Strickland DK (1994) The 39 kDa RAP regulates ligand binding by the VLDL receptor. J Biol Chem 269:23268-23273

Bazzi MD, Nelsestuen GL (1992) Interaction of annexin VI with membranes: highly restricted dissipation of clustered phospholipids in membranes containing phosphatidylethanolamine. Biochemistry 31:10406-10413

Beck KA, Nelson WJ (1996) The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. Am J Physiol 270:C1263-7C1270

Becker T, Weber K, Johnsson N (1990) Protein-protein recognition via short amphiphilic helices; a mutational analysis of the binding site of annexin II for p11. EMBO J 9:4207-4213

Beisiegel U (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol 6:117-122

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. Nature 341:162-164

Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci USA 88:8342-8346

Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994) The role of alpha<sub>2</sub>M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. In: Borth W, Feinmann RD, Gonias SL, Quigley JP, Strickland DK (ed) Biology of alpha<sub>2</sub>-macroglobulin, its receptor and related proteins. Annals of New York Academy of Science, vol 737, New York, p.53-69

Benevolensky D, Belikova Y, Mohammadzadeh R, Trouve P, Marotte F, Russo-Marie F, Samuel JL, Charlemagne D (2000) Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure. Lab Invest 80:123-133

Bennet V (1990) Spectrin based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasma. Physiol Rev 70:1029-1065

Bennet V, Gilligan DM (1993) The spectrin-based membrane skeleton and the micron-scale organization of the plasma membrane domain. Annu Rev Cell Biol 9:27-66

Benz J, Bergner A, Hofmann A, Demange P, Göttig P, Liemann S, Huber R, Voges D (1996) The structure of recombinant human annexin VI in crystals and membrane-bound. J Molec Biol 260:638-643

Berendes R, Voges D, Demange P, Huber R, Burger A (1993a) Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. Science 262:427-430

Berendes R, Burger A, Voges D, Demange P, Huber R (1993b) Calcium influx through annexin V ion channels into large unilamellar vesicles measured with fura-2. FEBS Lett 317:131-134

Bianchi R, Pula G, Ceccarelli P, Giambanco I, Donato R (1992) S-100 protein binds to annexin II and p11, the heavy and light chains of calpactin I. Biochim Biophys Acta 1160:67-75

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523

Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E (1994) Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 91:8592-8596

Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc Natl Acad Sci USA 85:7852-7856

Brambilla R, Zippel R, Sturani E, Morello L, Peres A, Alberghina L (1991) Characterization of the tyrosine phosphorylation of calpactin I (annexin II) induced by platelet-derived growth factor. Biochem J 278:447-452

Brown D, Rose J (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 68:533-544

Brown MS, Goldstein JL (1974) Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. Science 185:61-63

Brown MS, Goldstein JL (1975) Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. Cell 6:307-316

Brown MS, Goldstein JL (1976) Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptorbound low density lipoprotein. Cell 9:663-674 Brown MS, Goldstein JL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. J Lipid Res 21:505-517

Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 52:223-261

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 89:331-340

Brownawell AM, Creutz CE (1996) Calcium-dependent binding of the plasma protein apolipoprotein A-I to two members of the annexin family. Biochemistry 35:6839-6845

Bucci C, Parton RG, Mather ICH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. Cell 70:715-728

Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofmann A, Göttig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Römisch J, Weber K (1996) The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. J Mol Biol 257:839-847

Byers TJ, Branton D (1985) Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. Proc Natl Acad Sci USA 82:6153-6157

Casey PJ, Seabra MC (1996) Protein prenyltransferases. J Biol Chem 271:5289-5292

Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen tissue plasminogen activator (t-PA). J Biol Chem 269:21198-21203

Chan HC, Kaetzel MA, Gotter AL, Dedman JR, Nelson DJ (1994) Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase IIactivated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. J Biol Chem 269:32464-32468

Chang KS, Wang G, Freireich EJ, Daly M, Naylor SL, Trujillo JM (1992) Specific expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. Blood 79:1802-1810

Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. J Cell Biol 133:1217-1236

Chavrier P, Goud B (1999) The role of ARF and rab GTPases in membrane transport. Curr Opin Cell Biol 11:466-475

Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. J Biol Chem 265:31116-31123

Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR (2000) Scavenger receptor-BI (SR-BI) inhibits ATP binding cassette transporter 1 (ABC1)mediated cholesterol efflux in macrophages. J Biol Chem in press

Chow A, Gawler D (1999) Mapping the site of interaction between annexin VI and the p120<sup>GAP</sup> C2 domain. FEBS Lett 460:166-172

Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK (1998) Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. Int Rev Cytol 180:237-284

Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Cell 79:13-21

Clark DM, Moss SE, Wright NA, Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-calelectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. Histochemistry 96:405-412

Cole SP, Pinkoski MJ, Bhardwaj G, Deeley RG (1992) Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small lung cancer cell line. Br J Cancer 65:498-502

Conboy JG (1993) Structure, function and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. Sem Hematol 30:58-73

Cooper JA, Hunter T (1983) Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. J Biol Chem 258:1108-1115

Corvera S, D'Arrigo A, Stenmark H (1999) Phosphoinositides in membrane traffic. Curr Opin Cell Biol 11:460-465

Creutz CE (1992) The annexins and exocytosis. Science 258:924-930

Creutz CE, Zaks WJ, Hamman HC, Crane S, Martin WH, Gould KL, Oddie KM, Parsons SJ (1987) Identification of chromaffingranule binding proteins. J Biol Chem 262:1860-1868

Crompton MR, Owens RJ, Totty NF, Moss SE, Waterfield MD, Crumpton MJ (1988a) Primary structure of the human, membraneassociated calcium-binding protein p68: a novel member of a protein family. EMBO J 7:21-27

Crompton MR, Moss SE, Crumpton MJ (1988b) Diversity in the lipocortin/calpactin family. Cell 55:1-3

Croxtall JD, Flower RJ (1992) Lipocortin I mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 89:3571-3575

Croxtall JD, Waheed S, Choudhury Q, Anand R, Flower RJ (1993) N-terminal petide fragments of lipocortin I inhibit A549 cell growth and block EGF-induced stimulation of proliferation. Int J Cancer 54:153-158

Damke H, Baba T, van der Bliek AM, Schmid SL (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. J Cell Biol 131:69-80

Danieluk M, Bus R, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J (1999a) Affinity labeling of annexin VI with triazine dye, Cibacron blue 3GA. Probable interaction of the dye with c-terminal nucleotide-binding site within the annexin molecule. Acta Biochim Pol 46:419-429

Danieluk M, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J (1999b) Annexin VI interacts with adenine nucleotides and their analogs. Biochimie 81:717-726

Dargel R (1991) Biochemie und Pathobiochemie der Lipoproteine. 1.Auflage, Akademie Verlag, Berlin

Daro E, van den Sluijs P, Galli T, Mellman I (1996) Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. Proc Natl Acad Sci USA 93:9559-9564

Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 80:2258-2262

Davidson NO, Anant S, MacGinnitie AJ (1995) Apolipoprotein B messenger RNA editing: insights into the molecular regulation of post-transcriptional cytidine deamination. Curr Opin Lipidol 6:70-74

Davies AA, Moss SE, Crompton MR, Jones TA, Spurr NK, Sheer D (1989) The gene coding for the p68 calcium-binding protein is localized to bands q32-q34 of human chromosome 5, and to mouse chromosome 11. Hum Genet 82:234-238

Davis AJ, Butt JT, Walker JH, Moss SE, Gawler DJ (1996) The  $Ca^{2+}$ -dependent lipid binding domain of P120<sup>GAP</sup> mediates proteinprotein-interactions with  $Ca^{2+}$ -dependent membrane-binding proteins. J Biol Chem 271:24333-24336

Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russel DW, Brown MS (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. Nature 326:760-765

De BK, Misono KS, Lukas TJ, Mroczkowski B, Cohen S (1986) Calcium-dependent 35-kilodalton substrate for epidermal growth factor receptor/kinase isolated from normal tissue. J Biol Chem 261:13784-13792

Deckelbaum RJ, Shipley GG, Small DM (1977) Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. J Biol Chem 252:744-754

Deckert M, Ticchioni M, Bernard A (1996) Endocytosis of GPI-anchored proteins in human lymphocytes: role of glycolipid-based domains, actin cytoskeleton, and protein kinases. J Cell Biol 133:791-799

Dedman JR, Kaetzel MA (1992) Annexin VI. In: Moss SE (ed) The Annexins. Portland Press, London, p.125-137

Dell'Angelica EC, Ohno H, Ooi CE, Rabinovich E, Roche KW, Bonifacino JS (1997) AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. EMBO J 16:917-928

Desjardins M (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. Trends Cell Biol 5:183-186

Diaz R, Mayorga LS, Weidmann PJ, Rothman JE, Stahl P (1989) Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. Nature 339:398-400

Diaz-Munoz M, Hamilton SL, Kaetzel MA, Hazarika P, Dedman JR (1990) Modulation of calcium release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa Calcimedin). J Biol Chem 265:15894-15899

Dietschy JM (1984) Regulation of cholesterol metabolism in man and other species. Klein Wschr 62:338-345

Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR (1997) Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal rab GTPases from rab-GDI. EMBO J 16:465-472

Dixon J, Gladwin AJ, Loftus SK, Riley JH, Perveen R, Wasmuth JJ, Anand R, Dixon MJ (1994) A YAC contig encompassing the Treacher Collins syndrome critical region at 5q31.3-32. Am J Hum Genet 55:372-378

Donnelly SR, Moss SE (1997) Annexins in the secretory pathway. Cell Mol Life Sci 53:533-588

Driessen HPC, Newman RH, Freemont PS, Crumpton MJ (1992) A model of the structure of human annexin VI bound to lipid monolayers. FEBS Lett 306:75-79

Drust DS, Creutz CE (1988) Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. Nature 331:88-91

D'Souza-Schorey C, Guangpu L, Colombo MI, Stahl PD (1994) A regulatory role for ARF6 in receptor mediated endocytosis. Science 267:1175-1178

D'Souza-Schorey C, Boshans RL, McDonough M, Stahl PD, van Aelst L (1997) A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. EMBO J 16:5445-5454

D'Souza-Schorey C, van Donselaar E, Hsu VW, Yang C, Stahl PD, Peters PJ (1998) ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. J Cell Biol 140:603-616

Dunn KW, Maxfield FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. J Cell Biol 117:301-310

Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR (1989) Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. J Cell Biol 109:3303-3314

Dunn WA, Hubbard AL (1984) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics. J Cell Biol 98:2148-2159

Dunn WA, Conolly TP, Hubbard A (1986) Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. J Cell Biol 102:24-36

Edwards HC, Crumpton MJ (1991) Calcium-dependent phospholipid and arachidonic acid binding by the placental annexins VI and IV. Eur J Biochem 198:121-129

Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. J Clin Invest 90:2013-2021

Elovson J, Jacobs JC, Schumaker VN, Puppione DL (1985) Molecular weights of apoprotein B obtained from human low density lipoprotein (apoprotein B-PI) and from rat very low density lipoprotein (apoprotein B-PII). Biochemistry 24:1569-1578

Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. J Cell Biol 120:1357-1369

Falkow S, Isberg RR, Portnoy DA (1992) The interaction of bacteria with mammalian cells. Annu Rev Cell Biol 8:333-363

Fan H, Josic D, Lim YP, Reutter W (1995) cDNA cloning and tissue-specific regulation of expression of rat calcium-binding protein 65/67. Identification as a homologue of annexin VI. Eur J Biochem 230:741-751

Fava RA, Cohen S (1984) Isolation of a calcium-dependent 35 kilodalton substrate for the epidermal growth factor receptor/kinase from A431 cells. J Biol Chem 259:2636-2645

Feher MD, Webb JC, Patel DD, Lant AF, Mayne PD, Knight BL, Soutar AK (1993) Cholesterol-lowering drug therapy in a patient with receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 103:171-180

Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995) Rab7: an important regulator of late endocytotic membrane traffic. J Cell Biol 131:1435-1452

Fiedler K, Lafont F, Parton RG, Simons K (1995) Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. J Cell Biol 128:1043-1053

Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. J Lipid Res 38:1503-1521

Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE (1972) A protein cofactor of lecithin cholesterol acyltransferase. Biochem Biophys Res Commun 46:1943-1949

Filipek A, Gerke V, Weber K, Kuznicki J (1991) Characterization of the cell-cycle regulated protein calcyclin from Ehrlich ascites tumor cells; identification of two binding proteins obtained by  $Ca^{2+}$ -dependent affinity chromatography. Eur J Biochem 195:795-800

Fleet A, Ashworth R, Kubista H, Edwards H, Bolsover S, Mobbs P, Moss SE (1999) Inhibition of EGF-dependent calcium influx by annexin VI is splice form-specific. Biochem Biophys Res Commun 260:540-546

Fox MT, Prentice DA, Hughes JP (1991) Increases in p11 and annexin II proteins correlate with differentiation in the PC 12 pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 177:1188-1193

Friedrichson T, Kurzchalia TV (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. Nature 394:802-805

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem 67:481-507

Frykman PK, Brown MS, Yamamoto T, Goldstein JL, Herz J (1995) Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci USA 92:8453-8455

Fukui K, Sasaki T, Imazumi K, Matsuura Y, Nakanishi H, Takai Y (1997) Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. J Biol Chem 272:4655-4658

Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins C (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. J Cell Biol 120:77-83

Gagescu R, Gruenberg J, Smythe E (2000) Membrane dynamics in endocytosis: structure-function relationship. Traffic 2000 1:84-88

Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH (1999) Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. EMBO J 18:871-881

Garbuglia M, Verzini M, Donato R (1998) Annexin VI binds S100A1 and S100B and blocks the ability of S100A1 and S100B to inhibit desmin and GFAP assemblies into intermediate filaments. Cell Calcium 24:177-191

Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. Nature 394:432-433

Gerke V, Moss SE (1997) Review: Annexins and membrane dynamics. Biochim Biophys Acta 1357:129-154

Gerke V, Weber K (1984) Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein from brush borders; calcium-dependent binding to nonerythroid spectrin and F-actin. EMBO J 3:227-233

Gerke V, Weber K (1985) Calcium-dependent conformational changes in the 36-kDa subunit of intestinal protein I related to the 36-kDa target of Rous Sarcoma Virus tyrosine kinase. J Biol Chem 260:1688-1695

Geuze HJ, Slot JW, Schwartz AL (1987) Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. J Cell Biol 104:1715-1723

Ghosh RN, Maxfield FR (1995) Evidence for nonvectorial, retrograde transferrin trafficking in the early endosomes of HEp2 cells. J Cell Biol 128:549-561

Ghosh RN, Gelman DL, Maxfield FR (1994) Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting in HEp2 cells using confocal microscopy. J Cell Sci 107:2177-2189

Giambanco I, Verzini M, Donato R (1993) Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements. Biochem Biophys Res Commun 196:1221-1226

Gibbons GF (1990) Assembly and secretion of very-low-density lipoprotein. Biochem J 268:1-13

Gil G, Faust JR, Chin DJ, Goldstein JL, Brown MS (1985) Membrane-bound domain of HMGCoA reductase is required for sterolenhanced degradation of the enzyme. Cell 41:249-258

Ginsberg HN (1994) Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. Med Clin North Am 78:1-20

Ginsberg HN (1995) Synthesis and secretion of apolipoprotein B from cultured liver cells. Curr Opin Lipidol 6:275-280

Glenney JRJ, Tack BF (1985) Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. Proc Natl Acad Sci USA 82:7884-7888

Glenney JRJ, Zokas LM (1988) Antibodies to the N-terminus of calpactin II (p35) affect Ca<sup>2+</sup>-binding and phosphorylation by the epidermal growth factor receptor in vitro. Biochemistry 27:2069-2076

Glenney JRJ, Tack B, Powell MA (1987) Calpactins: two distinct Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid- and actin-binding proteins from lung and placenta. J Cell Biol 104:503-511

Gofman JW, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR (1954) The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. Plasma (Milano) 2:413-428

Goldberg J (1999) Structural and functional analysis of the ARF1 ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. Cell 96:893-902

Goldberg J, Le NA, Paterniti JRJ, Ginsberg HN, Lindgren FT, Brown WV (1982) Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. J Clin Invest 70:1184-1192

Goldberg J, Kandel JJ, Blum CB, Ginsberg HN (1986) Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. J Clin Invest 78:1523-1528

Goldstein JL, Brown MS (1975) Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism. Am J Med 58:147-150

Goldstein JL, Dana SE, Brown MS (1974) Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. Proc Natl Acad Sci USA 71:4288-4292

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russel DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu Rev Cell Biol 1:1-39

Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS (1995) Familial hypercholesterolemia. In: Scrivter CR (ed) The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York, NY, p.1981-2030

Goodman HR, Zimmer WE, Clark MB, Zagon IS, Barker JE, Bloom ML (1995) Brain spectrin: of mice and men. Brain Res Bull 36:593-606

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996)  $\beta$ -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. Nature 383:447-450

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) Rab5 controls early endosome fusion in vitro. Cell 64:915-925

Goslin K, Banker G (1991) Culturing Nerve Cells. 3.Auflage, Bradford Book, p.255-260

Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD (1993) Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. J Cell Biol 120:695-710

Gotto AMJ, Pownall HJ, Havel RJ (1986) Introduction to the plasma lipoproteins. Method Enzymol 128:3-41

Gould KL, Woodgett JR, Isacke CM, Hunter T (1986) The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo. Molec Cell Biol 6:2738-2744

Goulding NJ, Podgorski MR, Hall DN, Flower RJ, Browning JL, Pepinsky RB (1989) Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 48:843-850

Greenberg ME, Edelman GM (1983) Comparison of the 34,000-Da pp60<sup>src</sup> substrate and a 38,000-Da phospho-protein identified by monoclonal antibodies. J Biol Chem 258:8497-8502

Greenberg S (1995) Signal transduction of phagocytosis. Trends Cell Biol 5:93-99

Greenberg S, Silverstein SC (1993) Phagocytosis. In: Paul WE (ed) Fundamental Immunology. Raven, New York, p.941-964

Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jäckle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of LDL to the prelysosomal compartment. J Biol Chem 275:33806-33813

Griffin BA, Packard CJ (1994) Metabolism of VLDL and LDL subclasses. Curr Opin Lipidol 5:200-206

Griffin FMJ, Griffin JA, Leider JE (1975) Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J Exp Med 142: 1263-1282

Griffin FMJ, Griffin JA, Silverstein SC (1976) Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. J Exp Med 144:788-809

Gruenberg J, Maxfield FR (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. Curr Opin Cell Biol 7:552-563

Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. J Cell Biol 108:1301-1316

Gunteski-Hamblin AM, Song GJ, Walsh RA, Frenzke M, Biovin GP, Dorn GW, Kaetzel MA, Horseman ND, Dedman JR (1996) Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 270:H1091-H1100

Guo Q, Vasile E, Krieger M (1994) Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. J Cell Biol 125:1213-1224

Haddad L, Day IN, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins PN (1999) Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred. J Lipid Res 40:1113-1122

Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979) Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. J Cell Biol 81:382-395

Haigler HT, Schlaepfer DD, Burgess WH (1987) Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase  $A_2$  inhibitors. J Biol Chem 262:6921-6930

Haigler HT, Fitch JM, Jones JM, Schlaepfer DD (1989) Two lipocortin-like proteins, endonexin II and anchorin CII, may be alternate splices of the same gene. Trends Biochem Sci 14:48-50

Hajjar KA, Jaconiva AT, Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. J Biol Chem 269:21191-21197

Harder T, Gerke V (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II-2 p11-2 complex. J Cell Biol 123:1119-1132

Harder T, Gerke V (1994) The annexin II2p11(2) complex is the major protein component of the triton X-100-insoluble low-density fraction prepared from MDCK cells in the presence of  $Ca^{2+}$ . Biochim Biophys Acta 1223:375-382

Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. Curr Opin Cell Biol 9:534-542

Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J (1997) Specific release of membrane bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. Mol Biol Cell 8:533-545

Harris AS, Morrow JS (1990) Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. Proc Natl Acad Sci USA 87:3009-3013

Hattori T, Hoffman T, Hirata F (1983) Differentiation of a histiocytic lymphoma cell line by lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein. Biochem Biophys Res Commun 111:551-559

Havel RJ, Hamilton RL (1988) Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. Hepatology 8:1689-1704

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1953) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 34:1345-1353

Hawkins TE, Roes J, Rees D, Monkhouse J, Moss SE (1999) Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. Mol Cell Biol 19:8028-8032

Hayashi H, Owada MK, Sonobe S, Kakunga T (1989) Characterization of two distinct  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipid-binding proteins of 68-kDa isolated from human placenta. J Biol Chem 264:17222-17230

Hazarika P, Kaetzel MA, Sheldon A, Karin NJ, Fleischer S, Nelson TE, Dedman JR (1991) Annexin VI is associated with calciumsequestering organelles. J Cell Biochem 46:78-85

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin mediated internalization of caveolae. J Cell Biol 141:85-99

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepöhl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500 kDa liver membrane protein closely related to the LDL receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J 7:4119-4127

Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS (1990) Proteolytic processing of the 600 kDa LRP occurs in the trans golgi compartment. EMBO J 9:1769-1776

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of reelin to VLDL receptor and apoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron 24:481-489

Hinshaw JE, Schmid SL (1995) Dynamin self-assembles in rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. Nature 374:190-192

Hirata F, del Carmine R, Nelson CA, Axelrod J, Schiffmann E, Warabi A (1981) Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein, lipomodulin, in patients with rheumatic diseases. Proc Natl Acad Sci USA 78:3190-3194

Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat 1:445-466

Holleran EA, Tokito MK, Karki S, Holzbaur EL (1996) Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. J Cell Biol 135:1815-1829

Honegger AM, Dull TJ, Felder S, van Obberghen E, Bellot F, Szapary D, Schmidt A, Ullrich A, Schlessinger J (1987) Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. Cell 51:199-209

Hopkins CR (1983) The importance of the endosome in intracellular traffic. Nature 305:684-685

Hopkins CR, Trowbridge IS (1983) Internalization and processing of transferrin and transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. J Cell Biol 97:508-521

Hopkins CR, Gibson A, Shipman M, Strickland DK, Trowbridge IS (1994) In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and the routed to the plasma membrane of the leading lamella. J Cell Biol 125:1265-1274

Horecker BL (1976) Unravelling the pentose phosphate pathway. In: Kornberg A, Cornudella L, Horecker BL, Oro J (ed) Reflections on biochemistry. Pergamon, Oxford, p.65-72

Hosoya H, Kobayashi R, Tsukita S, Matsumura F (1992)  $Ca^{2+}$ -regulated actin and phospholipid binding protein (68 kD-protein) from bovine liver: identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. Cell Motil Cytoskel 22:200-210

Hospattankar AV, Law SW, Lackner K, Brewer HBJ (1986) Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. Biochem Biophys Res Commun 139:1078-1085

Huang KS, Wallner BP, Mattaliano RJ, Tizard R, Burne C, Frey A (1986) Two human 35 kDa inhibitors of phospholipase  $A_2$  are related to substrates of  $pp60^{v-src}$  and the epidermal growth factor receptor kinase. Cell 46:191-199

Huber R, Römisch J, Pâques EP (1990) The crystal and molekular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. EMBO J 9:3867-3874

Huber R, Berendes R, Burger A, Schneider M, Karshikov A, Luecke H (1992) Crystal and molekular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family proteins. J Molec Biol 223:683-704

Hunziker W, Fumey C, Honing S, Kamel LC (1994) Trafficking of immunoglobulin receptors in epithelial cell: signals and cellular factors. Cell Biol Int 18:321-325

Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A (1996) Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. Biochim Biophys Acta 1300:151-170

Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. Annu Rev Nutr 19:141-172

Innerarity TL, Mahley RW (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. Biochemistry 17:1440-1447

Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in knockout mice lacking the LDLR, apo E or both proteins. Proc Natl Acad Sci USA 91:4431-4435

Ishida BY, Albee D, Paigen B (1990) Interconversion of pre-beta migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. J Lipid Res 31:227-236

Jäckle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Groger I, Greten H, Windler E (1994) Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. J Biol Chem 269:1026-1032

Jahraus A, Storrie B, Griffiths G, Desjardins M (1994) Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. J Cell Sci 107:145-157

Jensen PH, Moestrup SK, Sottrup-Jensen L, Petersen CM, Gliemann J (1988) Receptors for alpha 2-macroglobulin- and pregnancy zone protein- proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. Placenta 9:436-477

Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge IS (1990) Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. J Cell Biol 110:283-294

Johnson AO, Ghosh RN, Dunn KW, Garippa R, Park G, Mayor S, Maxfield FR, McGraw TE (1996) Transferrin receptor containing the SDYQRL motif of TGN38 causes a reorganization of the recycling compartment but is not targeted to the TGN. J Cell Biol 135:1749-1762

Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A<sub>1</sub> slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. Mol Biol Cell 4:1251-1266

Johnsson N, Marriot G, Weber K (1988) p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. EMBO J 7:2435-2442

Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM (1992) Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. J Biol Chem 267:25976-25981

Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V (1997) Identification and characterization of novel type annexin-membrane interaction: calcium is not required for the association of annexin II with early endosomes. J Cell Sci 110:221-228

Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL (1998) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. Curr Biol 8:1399-1402

Junker M, Creutz CE (1993) Endonexin (annexin IV)-mediated lateral segregation of phosphatidylglycerol in phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes. Biochemistry 32:9968-9974

Kaetzel MA, Chan HC, Dubinsky WP, Dedman JR, Nelson DJ (1994a) A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance. J Biol Chem 269:5297-5302

Kaetzel MA, Pula G, Campos B, Uhrin P, Horseman N, Dedman JR (1994b) Annexin VI isoforms are differentially expressed in mammalian tissues. Biochim Biophys Acta 1223:368-374

Kamal A, Ying Y, Anderson RGW (1998) Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes. J Cell Biol 142:937-947

Kane JP (1996) Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ (ed) Atherosclerosis and coronary disease. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.89-103

Karshikov A, Berendes R, Burger A, Cavalie A, Lux HD, Huber R (1992) Annexin V membrane interaction: An electrostatic potential study. Eur Biophys J 20:337-344

Keen JH (1990) Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. Annu Rev Biochem 59:415-438

Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H (1996) Human apolipoprotein E receptor 2- a novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. J Biol Chem 271:8373-8380

Kirchhausen T (1993) Coated pits and coated vesicles-sorting it all out. Curr Opin Struct Biol 3:182-188

Kita T, Goldstein JL, Brown MS (1982) Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci USA 79:3623-3627

Klausner RD, van Renswode J, Ashwell G, Kempf C, Schechter AN, Dean A, Bridges KR (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells. J Biol Chem 258:4715-4724

Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. Nature 392:193-197

Kojima K, Utsumi H, Ogawa H, Matsumoto I (1994) Highly polarized expression of carbohydrate-binding protein p33/41 (annexin IV) on the apical plasma membrane of epithelial cells in renal proximal tubules. FEBS Lett 342:313-318

Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose-6-phophate/insulin like growth factor II receptors. Annu Rev Biochem 61:307-330

Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS (1989) LRP mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoE-enriched lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 86:5810-5814

Kreis TE, Pepperkok R (1994) Coat proteins in intracellular membrane transport. Curr Opin Cell Biol 6:533-537

Krieger M, Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). Annu Rev Biochem 63:601-637

Ktistakis NT, Thomas D, Roth MG (1990) Characteristics of the tyrosine recognition signal for internalization of transmembrane surface glycoproteins. J Cell Biol 111:1393-1407

Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (1996) Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. J Cell Biol 134:295-306

Kuijpers GA, Lee G, Pollard HB (1992) Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules and chromaffin cells: evidence for a dynamic role in the secretory process. Cell Tiss Res 269:323-330

Kuitake ST, Mendel CM, Hennessy LK (1992) Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. J Lipid Res 33:1807-1816

Kumble KD, Hirota M, Pour PM, Vishwanatha JK (1992) Enhanced levels of annexins in pancreatic carcinoma cells of Syrian hamsters and their intrapancreatic allografts. Cancer Res 52:163-167

Kurten RC, Cadena DL, Gill GN (1996) Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. Science 272:1008-1010

Kurzchalia TV, Parton RG (1999) Membrane microdomains and caveolae. Curr Opin Cell Biol 11:424-431

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Lamaze C, Schmid SL (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. Curr Opin Cell Biol 7:573-580

Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. J Biol Chem 272:20332-20335

Lange Y, Steck TL (1996) The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. Trends Cell Biol 6:205-208

Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Feruson SG, Caron MG, Barak LS (1999) The  $\beta_2$ -adrenergic receptor/ $\beta$ -arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 96:3712-3717

LaRosa JC, Levy RI, Herbert PN, Lux SE, Fredrickson DS (1970) A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem Biophys Res Commun 41:57-62

Lazarovits J, Roth M (1988) A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. Cell 53:743-752

Le-Cabec V, Maridonneau-Parini I (1994) Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. Biochem J 303:481-487

Lee A, Frank DW, Marks MS, Lemmon MA (1999) Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by an dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. Curr Biol 9:261-264

Liemann S, Huber R (1997) Three-dimensional structure of annexins. Cell Mol Life Sci 53:516-521

Lin HC, Moore MS, Sanan DA, Anderson RGW (1991) Reconstitution of clathrin-coated pit budding from plasma membranes. J Cell Biol 114:881-891

Lin HC, Südhof TC, Anderson RGW (1992) Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits. Cell 70:283-291

Linderman JJ, Lauffenburger DA (1988) Analysis of intracellular receptor/ligand sorting in endosomes. J Theor Biol 132:203-245

Liu L, Fisher AB, Zimmerman UJ (1995) Regulation of annexin I by proteolysis in rat alveolar epithelial type II cells. Biochem Mol Biol Int 36:373-381

Lobel P, Fujimoto RDYE, Griffiths G, Kornfeld S (1989) Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose-6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. Cell 57:787-796

Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer S (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans-Golgi network. EMBO J 12:677-682

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:165-175

Luckcuck T, Trotter PJ, Walker JH (1998) Localization of annexin VI in the adult and neonatal heart. Cell Biol Int 22:199-205

Luecke H, Chang BT, Mailliard WS, Schlaepfer DD, Haigler HT (1995) Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. Nature 378:512-515

Luskey KL, Faust JR, Chin DJ, Brown MS, Goldstein JL (1983) Amplification of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, but not for the 53 kDa protein, in UT-1 cells. J Biol Chem 258:8462-8469

Mahley RW, Hussain MM (1991) Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. Curr Opin Lipidol 2/3:170-176

Mailliard WS, Haigler HT, Schlaepfer DD (1996) Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I. J Biol Chem 271:719-725

Marino M, Zheng G, McCluskey RT (1999) Megalin (gp330) is an endocytic receptor for thyroglobulin on cultured fisher rat thyroid cells. J Biol Chem 274:12898-12904

Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS (1996) Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. J Cell Biol 135:341-354

Marsh M, Griffiths G, Dean GE, Mellman I, Helenius A (1986) Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. Proc Natl Acad Sci USA 83:2899-2903

Martinez R, Nakamura KD, Weber MJ (1982) Identification of phosphotyrosine containing proteins in untransformed and Rous sarcoma transformed chicken embryo fibroblasts. Molec Cell Biochem 2:653-665

Martys JL, Shevell T, McGraw TE (1995) Studies of transferrin recycling reconstituted in streptolysin O permeabilized Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 270:25976-25984

Massey D, Traverso V, Maroux S (1991) Lipocortin IV is a basolateral cytoskeleton constituent of rabbit enterocytes. J Biol Chem 266:3125-3130

Massey-Harroche D, Traverso V, Mayran N, Francou V, Vandewalle A, Maroux S (1995) Changes in expression and subcellular localization of annexin IV in rabbit kidney proximal tubule cells during primary culture. J Cell Physiol 165:313-322

Matsui W, Kirchhausen T (1990) Stabilization of clathrin coats by the core of the clathrin-associated protein complex AP 2. Biochemistry 29:10791-10798

Matteo RG, Moravec CS (2000) Immunolocalization of annexins IV, V and VI in the failing and non-failing human heart. Cardiovasc Res 45:961-970

Maxfield FR, Yamashiro DJ (1991) Acidification of organelles and the intracellular sorting of proteins during endocytosis. In: Steer CJ, Hanover JA (ed) Intracellular trafficking of proteins. Cambridge University Press, Cambridge, p.157-182

Mayor S, Presley JF, Maxfield FR (1993) Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. J Cell Biol 121:1257-1269

Mayorga LS, Beron W, Sarrouf MN, Colombo MI, Creutz CE, Stahl PD (1994) Calcium-dependent fusion among endosomes. J Biol Chem 269:30927-30934

Mayran N, Traverso V, Maroux S, Massey-Harroche D (1996) Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 14:L863-L871

McFarlane AS (1958) Efficient trace labeling of proteins with iodine. Nature 182:53-57

McGraw TE, Maxfield FR (1990) Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. Cell Regul 1:369-377

McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR (1988) Phorbol ester treatment increases the exocytic rate of the transferrin receptor recycling pathway independent of serine-24 phosphorylation. J Cell Biol 106:1061-1066

McMahon HAT, Ushkaryov YA, Edelmann L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Sudhof TC (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. Nature 364:346-349

Meers P, Daleke D, Hong K, Papahadjopoulos D (1991) Interactions of annexins with membrane phospholipids. Biochemistry 30:2903-2908

Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA (1999) Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med 340:994-1004

Mestecky J, McGhee JR (1987) Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. Adv Immunol 40:123-245

Metchnikoff E (1893) Lectures on the comparative pathology of inflammation. Paul, Kegan, Trench & Trabner. London.

Michaely P, Kamal A, Anderson RGW, Bennett V (1999) A requirement for ankyrin binding to clathrin during coated pit budding. J Biol Chem 274:35908-35913

Mizoguchi A, Yano Y, Hamaguchi H, Yanagida H, Die C, Zahraoui A, Shirataki H, Sasaki T, Takai Y (1994) Localization of rabphilin-3A on the synaptic vesicle. Biochem Biophys Res Commun 202:1235-1243

Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H (1992) CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. J Biol Chem 267:13498-13504

Mizutani A, Tokumitsu H, Kobayashi R, Hidaka H (1993) Phosphorylation of annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 cells. J Biol Chem 268:15517-15522

Mizutani A, Watanabe N, Kitao T, Tokumitsu H, Hidaka H (1995) The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization. Arch Biochem Biophys 318:157-165

Mollenhauer J (1997) Annexins: what are they good for? Cell Mol Life Sci 53:506-507

Morgan RO, Fernandez MP (1997) Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. Cell Mol Life Sci 53:508-515

Moss J, Vaughan M (1998) Molecules in the ARF orbit. J Biol Chem 273:21431-21434

Moss SE, Crumpton MJ (1990) Alternative splicing gives rise to two forms of the p68  $Ca^{2+}$ -binding protein. FEBS Lett 261:299-302

Moss SE, Crompton MR, Crumpton MJ (1988) Molecular cloning of murine p68, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein of the lipocortin family. Eur J Biochem 177:21-27

Moss SE, Edwards HC, Crumpton MJ (1991) Diversity in the annexin family. In: Heizmann CW (ed) Novel calcium-binding proteins. Springer-Verlag, Berlin, p.535-566

Moss SE, Jacob SM, Davies AA, Crumpton MJ (1992) A growth-dependent post-translational modification of annexin VI. Biochim Biophys Acta 1160:120-126

Mostov KE (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. Annu Rev Immunol 12:63-84

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. Physiol Rev 77:759-803

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 92:10339-10343

Nakata T, Sobue K, Hirokawa N (1990) Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. J Cell Biol 110:13-25

Nelson WJ (1991) Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. Semin Cell Biol 2:375-385

Newman R, Tucker A, Ferguson C, Tsernoglou D, Leonard K, Crumpton MJ (1989) Crystallization of p68 on lipid monolayers and as three-dimensional single crystals. J Mol Biol 206:213-219

Niemeier A, Willnow T, Dieplinger H, Jacobsen C, Meyer N, Hilpert J, Beisiegel U (1999) Identification of megalin/gp330 as a receptor for lipoprotein(a) in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:552-561

Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C (1995) Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. Immunity 3:783-791

Norman D, Sun XM, Bourbon M, Knight BL, Naoumova RP, Soutar AK (1999) Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. J Clin Invest 104:619-628

Novick P, Zerial M (1997) The diversity of rab proteins in vesicle transport. Curr Opin Cell Biol 9:496-504

Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U, Gliemann J (1993) The  $\alpha 2$ macroglobulin receptor/LDL receptor related protein binds lipoprotein lipase and  $\beta$ -migrating VLDL associated with the lipase. J Biol Chem 268:15048-15055

Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE (1999) An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D-3. Cell 96:507-515

Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. J Cell Biol 141:101-114

Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimara T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R, Takahara JEA (1995) Involvement of annexin I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. Endocrinology 136:2421-2426

Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin associated proteins. Science 269:1872-1875

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G (1993) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. Curr Opin Lipidol 4/3:187-196

Omary MB, Trowbridge IS (1981) Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. J Biol Chem 256:12888-12892

Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (1998) ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. J Cell Biol 142:391-402

Ortega D, Pol A, Biermer M, Jäckle S, Enrich C (1998) Annexin VI defines an apical 'early' recycling endocytic compartment in rat liver hepatocytes. J Cell Sci 111:261-269

Osborn M, Johnsson N, Wehland J, Weber K (1988) The submembraneous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60src kinase in situ. Exp Cell Res 175:81-96

Owens RJ, Crumpton MJ (1984) Isolation and characterization of a novel 68.000-Mr binding protein of lymphocyte plasma membrane. Biochem J 219:309-316

Paris S, Beraud-Dufour S, Robineau S, Bigay J, Antonny B, Chabre M, Chardin P (1997) Role of protein-phospholipid interactions in the activation of the ARF1 by the guarine nucleotide exchange factor Arno. J Biol Chem 272:22221-22226

Patki V, Virbasius J, Lane WS, Toh B, Sheptner HS, Corvera S (1997) Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci USA 94:7326-7330

Pearse BMF (1988) Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. EMBO J 7:3331-3336

Pearse BMF, Robinson MS (1984) Purification and properties of 100 kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin. EMBO J 3:1951-1957

Pelchen-Matthews A, Armes JE, Griffiths G, Marsh M (1991) Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and non-lymphocytic cells. J Exp Med 173:575-587

Pepinski RB, Sinclair LK (1986) Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. Nature 321:81-84

Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, O'Brine-Greco B (1989) A dimeric form of lipocortin-1 in human placenta. Biochem J 263:97-103

Peränen J, Auvinen P, Virta H, Wepf R, Simons K (1996) Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. J Cell Biol 135:153-167

Pierre P, Scheel J, Rickard JE, Kreis TE (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. Cell 70:887-900

Pitt A, Mayorga LS, Schwartz AL, Stahl PD (1992) Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. J Biol Chem 267:126-132

Pollard HB, Rojas E (1988)  $Ca^{2+}$ -activated synexin forms highly selective, voltage-gated  $Ca^{2+}$ -channels in phosphatidylserine bilayer membranes. Proc Natl Acad Sci USA 85:2974-2978

Pons M, Ihrke G, Koch S, Biermer M, Pol A, Grewal T, Jäckle S, Enrich C (2000) Late endocytic compartments are major sites of annexin VI localization in NRK fibroblasts and polarized WIF-B hepatoma cells. Exp Cell Res 257:33-47

Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001) Evidence for the involvement of Annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. Exp Cell Res 269:13-22

Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J (1987) A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell 50:831-840

Powell MA, Glenney Jr. JR (1987) Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by pp60<sup>v-src</sup>. Biochem J 247:321-328

Presley JF, Mayor S, Dunn KW, Johnson LS, McGraw TE, Maxfield FR (1993) The End2 mutation in CHO cells slows the rate of exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. J Cell Biol 122:1231-1241

Puck TT, Kao FT (1968) Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and Isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. Proc Natl Acad Sci USA 60:1277-1281

Rabinovitch M (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol 5:85-88

Racoosin EL, Swanson JA (1992) M-CSF-induced macropinocytosis increase solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. J Cell Sci 102:867-880

Radhakrishna H, Donaldson JG (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. J Cell Biol 139:49-61

Rainteau D, Mansuelle P, Rochat H, Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. FEBS Lett 360:80-84

Rand JH, Wu XX, Guller S (1994) Reduction of annexin V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 171:1566-1572

Rand JH, Wu XX, Andree HAM (1997) Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome – a possible thrombogenic mechanism. N Engl J Med 337:154-160

Rao K, van Renswoude J, Kempf C, Klausner RD (1983) Separation of  $Fe^{3+}$  from transferrin in endocytosis. Role of the acidic endosome. FEBS Lett 160:213-216

Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calciumand phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1197:63-93

Reeves SA, Chavez-Kappel C, Davis R, Rosenblum M, Israel MA (1992) Developmental regulation of annexin II (Lipocortin 2) in human brain and expression in high grade glioma. Cancer Res 52:6871-6876

Reutelingsperger CPM, van Heerde WL (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. Cell Mol Life Sci 53:527-532

Riederer MA, Soldati T, Shapiro AD, Lin J, Pfeffer SR (1994) Lysosome biogenesis requires rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. J Cell Biol 125:573-582

Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M (1997) A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 94:12610-12615

Rinninger F, Brundert M, Jäckle S, Galle PR, Busch C, Izbicki JR, Rogiers X, Henne-Bruns D, Kremer B, Broelsch CE, Greten H (1994) Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human hepatocytes in primary culture. Hepatology 19:1110-1114

Robinson LJ, Martin TF (1998) Docking and fusion in neurosecretion. Curr Opin Cell Biol 10:483-492

Robinson MS (1992) Adaptins. Trends Cell Biol 2:293-297

Robinson MS (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr Opin Cell Biol 6:538-544

Robinson MS, Watts C, Zerial M (1996) Membrane dynamics in endocytosis. Cell 84:13-21

Rodriguez L, Stirling CJ, Woodman PG (1994) Multiple NEM-sensitive components are required for endosomal vesicle fusion. Mol Biol Cell 5:773-783

Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J (1998) Inducible inactivation of hepatic LRP gene by Cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. J Clin Invest 101:689-695

Rojas E, Pollard HB, Haigler HT, Parra C, Burns AL (1990) Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. J Biol Chem 265:21207-21215

Rome LH (1985) Curling receptors. Trends Biochem Sci 10:151

Roseman BJ, Bollen A, Hsu J, Lamborn K, Israel MA (1994) Annexin II marks astrocytic brain tumours of high histologic grade. Oncol Res 6:561-567

Roth MG, Doyle C, Sambrook J, Gething MJ (1986) Heterologous transmembrane and cytoplasmic domains direct functional chimeric influenza virus hemagglutinins into the endocytic pathway. J Cell Biol 102:1271-1283

Roth TF, Porter KR (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes aegypti L. J Cell Biol 20:313-332

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell 68:673-682

Rothhut B (1997) Participation of annexins in protein phosphorylation. Cell Mol Life Sci 53:522-526

Rothman JE (1996) The protein machinery of vesicle budding and fusion. Protein Sci 5:185-194

Rothman JE, Schmid SL (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. Cell 46:5-9

Rubinstein DC, Cohen JC, Berger GM, van der Westhuyzen DR, Coetze GA, Gevers W (1990) Chylomicron remnant clearance in the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. J Clin Inv 86:1306-1312

Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL (1983) cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 80:7501-7505

Russell DW, Schneider WJ, Yahamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL (1984) Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. Cell 37:577-585

Russell DW, Brown MS, Goldstein JL (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. J Biol Chem 264:21682-21688

Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. Proc Natl Acad Sci USA 91:9725-9729

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. J Exp Med 182:389-400

Sambrook J, Fritsche EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1991) The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. J Cell Biol 114:1135-1147

Sarkar A, Yang P, Fan YH, Mu ZM, Hauptmann R, Adolf GR (1994) Regulation of the expression of annexin VIII in acute promyelocytic leukemia. Blood 84:279-286

Sasaki T, Kikuchi Y, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T (1984) Comparative specifity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occuring peptides and synthetic fluorogenic substrates. J Biol Chem 259:12489-12494

Sasaki T, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Isomura M, Kuroda S, Takai Y (1994) Purification and charakterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. J Biol Chem 265:2333-2337

Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ (1989) Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. J Biol Chem 264:4349-4355

Schalk I, Zeng K, Wu SK, Stura EA, Matteson J, Huang M, Tandon A, Wilson IA, Balch WE (1996) Structure and mutational analysis of rab GDP-dissociation inhibitor. Nature 381:42-48

Schekman R, Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. Science 271:1526-1531

Schlaepfer DD, Haigler HAT (1987) Characterization of calcium-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I. J Biol Chem 262:6951-6957

Schlaepfer DD, Haigler HAT (1988) In vitro protein kinase C phosphorylation sites of placental lipocortin. Biochemistry 27:4253-4258

Schlaepfer DD, Haigler HAT (1990) Expression of annexins as a function of cellular growth state. J Cell Biol 111:229-238

Schmid SL (1992) The mechanism of receptor-mediated endocytosis: more questions than answers. Bioessays 14:589-596

Schmid SL, Carter LL (1990) ATP is required for receptor mediated endocytosis in intact cells. J Cell Biol 111:2307-2313

Schmid SL, Smythe E (1991) Stage-specific assays for coated pit formation and coated vesicle budding in vitro. J Cell Biol 114:869-880

Schmidt HH, Stuhrmann M, Shamburek R, Schewe CK, Ebhardt M, Zech AL, Buttner C, Wendt M, Beisiegel U, Brewer HB jr, Manns MP (1998) Delayed low density lipoprotein (LDL) catabolism despite a functional intact LDL-apolipoprotein B particle and LDL-receptor in a subject with clinical homozygous familial hypercholesterolemia. J Clin Endocrinol Metab 83:2167-2174

Schmitz-Pfeiffer C, Browne CL, Walker JH, Bide TJ (1998) Activated protein kinase C  $\alpha$  associates with annexin VI from skeletal muscle. Biochem J 330:675-681

Schneider C, Sutherland R, Newman R, Greaves M (1982) Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. J Biol Chem 257:8516-8522

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. J Cell Biol 127:1217-1232

Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. J Biol Chem 270:14399-14404

Schwartz AL (1995) Receptor cell biology: receptor-mediated endocytosis. Pediatric Res 38:835-841

Seemann J, Weber K, Gerke V (1996a) Structural requirements for annexin I-S100C complex formation. Biochem J 319:123-129

Seemann J, Weber K, Osborn M, Parton RG, Gerke V (1996b) The association of annexin I with early endosomes is regulated by  $Ca^{2+}$  and requires an intact N-terminal domain. Mol Biol Cell 7:1359-1374

Selbert S, Fischer P, Pongratz D, Stewart M, Noegel AA (1995) Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. J Cell Sci 108:85-95

Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H (1994) Quick-freeze, deep-etch visualisation of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin filament bundling. Cell Tiss Res 277:51-60

Shen F, Seabra MC (1996) Mechanisms of digeranylgeranylation of rab proteins. J Biol Chem 271:3692-3698

Shibata S, Sato H, Maki M (1992) Calphobindings (placental annexins) inhibit protein kinase C. J Biochem 112:522-556

Shirataki H, Zkaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi K, Wada K, Miyazaki M, Takai Y (1993) Rabphilin-3A, a putative target for smg p25A/rab3A small GTP-binding protein related to synaptotagmin. Mol Cell Biol 13:2061-2068

Silva FG, Sherrill K, Spurgeon S, Südhof TC, Stone DK (1986) High-level expression of the 32.5-kilodalton calelectrin in ductal epithelia as revealed by immunochemistry. Differentiation 33:175-183

Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998) EEA1 links PI(3)K function to rab5 regulation of endosome fusion. Nature 394:494-498

Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RGW (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. J Biol Chem 271:29427-29435

Smith PD, Moss SE (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. Trends Genet 10:241-246

Smith VL, Dedman JR (1986) An immunological comparison of several novel calcium-binding proteins. J Biol Chem 261:15815-15818

Smythe E, Smith PD, Jacob SM, Theobald J, Moss SE (1994) Endocytosis occurs independently of annexin VI in human A431 cells. J Cell Biol 124:301-306

Soldati T, Shapiro AD, Svejstrup AB, Pfeffer SR (1994) Membrane targeting of the small GTPase rab9 is accompanied by nucleotide exchange. Nature 369:76-78

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362:318-324

Song W, Apodaca G, Mostov K (1994) Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor is regulated in multiple intracellular compartments. J Biol Chem 269:29474-29480

Song W, Vaerman JP, Mostov K (1995) Dimeric and tetrameric IgA are transcytosed equally by the polymeric Ig receptor. J Immunol 155:715-721

Sorkin A, Carpenter G (1993) Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins. Science 261:612-615

Spang A, Matsuoka K, Hamamoto S, Schekman R, Orci L (1998) Coatomer, ARF1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. Proc Natl Acad Sci USA 95:11199-11204

Spreca A, Rambotti MG, Giambanco I, Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Donato R (1992) Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart. J Cell Physiol 152:587-598

Stanley KK, Kocher HP, Luzio JP, Jackson P, Tschopp J, Dickson J (1985) The sequence and topology of human complement component C9. EMBO J 4:375-382

Stefansson S, Chappell DA, Argraves KM, Strickland DK, Argraves WS (1995) Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptorrelated protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. J Biol Chem 270:19417-19421

Stenmark H, Parton HG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. EMBO J 13:1287-1296

Stenmark H, Vitale G, Ullrich O, Zerial M (1995) Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. Cell 83:423-432

Stevens TR, Smith SF, Rampton DS (1993) Antibodies to human recombinant lipocortin-1 in inflammatory bowel disease. Clin Sci 84:381-386

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS (1990) Sequence identity between the  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this protein is a multifunctional receptor. J Biol Chem 265:17404-17404

Südhof TC, Slaughter CA, Leznicki I, Barjon P, Reynolds GA (1988) Human 67-kDa calelectrin contains a duplication of four repeats found in 35-kDa lipocortins. Proc Natl Acad Sci USA 85:664-668

Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK (1997) Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:3092-3101

Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK (1998) Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. Atherosclerosis 136:175-185

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, van Berkel THC, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature 386:292-296

Swairjo MA, Seaton BA (1994) Annexin structure and membrane. Interactions: A molecular perspective. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23:193-213

Swairjo MA, Concha NO, Kaetzel MA, Dedman JR, Seaton BA (1995) Ca<sup>2+</sup>-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. Nature Struct Biol 2:968-974

Swanson JA, Baer SC (1995) Phagocytosis by zippers and triggers. Trends Cell Biol 5:89-93

Tabas I (1995) The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. Curr Opin Immunol 6:260-268

Tagoe CE, Boustead CM, Higgins SJ, Walker JH (1994) Characterization and immunolocalization of rat liver annexin VI. Biochim Biophys Acta 1192:272-280

Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T (1992) Rabbit VLDLR: a LDL receptor-like protein with distinct ligand specifity. Proc Natl Acad Sci USA 89:9252-9256

Takahashi Y, Smith JD (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci USA 96:11358-11363

Takai K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by  $GTP\gamma$  S in nerve terminals. Nature 374:186-190

Tamer CM, Lamm ME, Robinson JK, Piskurich JF, Kaetzel CS (1995) Comparative studies of transcytosis and assembly of secretory IgA in Madin-Darby canine kidney cells expressing human polymeric Ig receptor. J Immunol 155:707-714

Theobald J, Smith PD, Jacob SM, Moss SE (1994) Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells suppresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation. Biochim Biophys Acta 1223:383-390

Theobald J, Hanby A, Patel K, Moss SE (1995) Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431 squamous epithelial carcinoma cells. Br J Cancer 71:786-788

Thiel C, Osborn M, Gerke V (1992) The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembraneous cytoskeleton depends on intact p11- and  $Ca^{2+}$ -binding sites. J Cell Sci 103:733-742

Tokumitsu H, Mizutani A, Minami H, Kobayashi R, Hidaka H (1992) A calcyclin-associated protein is a newly identified member of the Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding proteins, annexin family. J Biol Chem 267:8919-8924

Tooze J, Hollinshead M (1991) Tubular early endosomal network in AtT20 and other cells. J Cell Biol 115:635-654

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/Disabled-like Disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and apoE receptor 2. Cell 97:689-701

Tso P, Balint JA (1986) Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. Am J Physiol 250:G715-726

Tufty RM, Kretsinger RH (1975) Troponin and parvalbumin calcium binding regions predicted in myosin light chain and T4 lysozyme. Science 187:167-169

Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, de Paillerets C, Alfsen A, Bomsel M (1998) In adrenocortical tissue, annexins II and VI are attached to clathrin coated vesicles in a calcium-independent manner. Biochim Biophys Acta 1402:115-130

Tycko B, Maxfield FR (1982) Acidification of endocytotic vesicles containing  $\alpha_2$ -macroglobulin. Cell 28:643-651

Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M (1994) Membrane association of rab5 mediated by the GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. Nature 368:157-160

Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. J Cell Biol 135:913-924

Vallis Y, Wigge P, Marks B, Evans PR, McMahon HT (1999) Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. Curr Biol 9:257-260

Vance DE, Vance JE (1991) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. New Comprehensive Biochemistry 20. Elsevier, Amsterdam

Vance JE, Vance DE (1990) Lipoprotein assembley and secretion by hepatocytes. Ann Rev Nutr 10:337-356

Van der Sluijs P, Hull P, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell 70:729-740

Van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K, Hansen SH (1993) Multivesicular bodies in HEp2 cells are maturating endosomes. Eur J Cell Biol 61:208-224

Van Weert AVM, Dunn KW, Geuze HJ, Maxfield FR, Stoorvogel W (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. J Cell Biol 130:821-834

Varma R, Mayor S (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. Nature 394:798-801

Varticovski L, Chahwala SB, Whitman M, Cantley L, Schindler D, Chow EP (1988) Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. Biochemistry 27:3682-3690

Vishwanatha JK, Chiang Y, Kumble KD, Hollingsworth MA, Pour PM (1993) Enhanced expression of annexin II in human pancreatic carcinoma cells and primary pancreatic cancers. Carcinogenesis 14:2575-2579

Von Eckardstein A (1996) Cholesterol efflux from macrophages and other cells. Curr Opin Lipidol 7:308-319

Von der Mark K, Mollenhauer J (1997) Annexin V interactions with collagen. Cell Mol Life Sci 53:539-545

Wang W, Creutz CE (1994) Role of the amino-terminal domain in regulating interactions of annexin I with membranes: effects of amino-terminal truncation and mutagenesis of the phosphorylation sites. Biochemistry 33:275-282

Watanabe T, Inui M, Chen BY, Iga M, Sobue K (1994) Annexin VI-binding proteins in brain. Interaction of annexin VI with a membrane skeletal protein, calspectin (brain spectrin or fodrin). J Biol Chem 269:17656-17662

Webb JC, Patel DD, Jones MD, Knight BL, Soutar AK (1994) Characterization and tissue specific expression of the human VLDLR mRNA. Human Mol Gen 3:531-537

Weinman JS, Feinberg JM, Rainteau DP, Della Gaspera B, Weinman SJ (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. Cell Tissue Res 278:389-397

Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, Sparrow JT (1983) The receptor-binding domain of human apolipoprotein E: Monoclonal antibody inhibition of binding. J Biol Chem 258:12348-12354

Weng X, Luecke H, Song IS, Kang DS, Kim SH, Huber R (1993) Crystal structure of human annexin I at 2,5 A resolution. Prot Sci 2:448-458

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH (1979) Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. Clin Chem 25:1531-1546

Wice BM, Gordon JI (1992) A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin. J Cell Biol 116:405-422

Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. Trends Neurosci 21:339-344

Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J (1996) Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. Proc Natl Acad Sci USA 93:8460-8464

Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothman JE (1992) A multisubunit particle implicated in membrane fusion. J Cell Biol 117:531-538

Wolf BB, Lopes MB, Vandenberg SR, Gonias SL (1992) Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. Am J Pathol 141:37-42

Wood T (1985) The pentose phosphate pathway. Academic Press, London/New York

Yamaguchi T, Shirataki H, Kishida S, Miyazaki M, Nishikawa J, Wada K, Numata S, Kaibuchi K, Takai Y(1993) Two functionally different domains of rabphilin-3A, rab3A p25/smg p25A-binding and phospholipid- and Ca<sup>2+</sup>-binding domains. J Biol Chem 268:27164-27170

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW (1984) The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. Cell 39:27-38

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119

Yoshizaki H, Tanabe S, Arai K, Murakami A, Wada Y, Ohkuchi M, Hashimoto Y, Maki M (1992) Effects of calphobindin II (annexin VI) on procoagulant and anticoagulant activities of cultured endothelial cells. Chem&Pharm Bull 40:1860-1863

Zaks WJ, Creutz CE (1991) Ca<sup>2+</sup>-dependent annexin self-association on membrane surfaces. Biochemistry 30:9607-9615

Zambon A, Schmidt I, Beisiegel U, Brunzell JD (1996) Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. J Lipid Res 37:2394-2404

Zerial M, Stenmark H (1993) Rab GTPases in vesicular transport. Curr Opin Cell Biol 5:613-620

# 8. ANHANG

# 8.1. Expressionsvektoren





A Isolierte Annexin VI-Fragmente wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ kloniert. B PCR-Fragmente wurden in den pGEMT-Easy Vektor subkloniert. C pCMV5-EX-AII diente der Expression von humanem Annexin II (Thiel et al., 1992). D Humaner LDL-Rezeptor wurde mit pCMVhLDLR exprimiert. E pCMV-SPORT-ßGal ermöglichte die Expression von ß-Galaktosidase.

# 8.2. Aminosäuresequenzen

## Annexin VI:

MAKIAQGAMYRGSVHDFADFD<sup>|1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR<sup>|2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ<sup>|</sup>GTRENDDVV<sup>|3</sup>SEDLVQQDVQDLYEA GELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR<sup>|4</sup>S TPEYFAERLFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKA LLKLCGGDD<sup>|</sup>DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFNP<sup>|5</sup>DADAKALRKA MKGIGTDEATIIDIITQRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDLMADLKSEISGDLARLILGLMM<sup>|6</sup>PPAHYD AKQLKKAMEGAGTDEKALIEILATRTNAEIRAINEAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRILISLAT |GNREEGGEN<sup>|7</sup>RDQAQEDAQVAAEILEIADTPSGDKTSLETRFMTVLCTRSYPHLRRVFQEFIKK TNYDIEHVIKKEMSGDVKDAFVAIVQSVKN<sup>|8</sup>KPLFFADKLYKSMKGAGTDEKTLTRVMVSRSE IDLLNIRREFIEKYDKSPHQAIEGDTSGDFMKALLALCGGED<sup>|</sup>

## ∆*aa8-15:*

MAKIAQGDFADFD<sup>1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSYKSLYGKDLI ADLKYELTGKFERLIVNLMR<sup>2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQIHQLVAAYKD AYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ<sup>3</sup>SEDLVQQDVQDLYEAGELKWGTDE AQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR<sup>4</sup>STPEYFAERLF KAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKALLKLCGGDD<sup>1</sup> DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFNP<sup>5</sup>DADAKALRKAMKGIGTDEATI IDIITQRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDLMADLKSEISGDLARLILGLMM<sup>6</sup>PPAHYDAKQLKKAME GAGTDEKALIEILATRTNAEIRAINEAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRILISLAT<sup>1</sup>GNREEGGEN <sup>7</sup>RDQAQEDAQVAAEILEIADTPSGDKTSLETRFMTVLCTRSYPHLRRVFQEFIKKTNYDIEHVIK KEMSGDVKDAFVAIVQSVKN<sup>8</sup>KPLFFADKLYKSMKGAGTDEKTLTRVMVSRSEIDLLNIRREFI EKYDKSPHQAIEGDTSGDFMKALLALCGGED

# *aa10 Tyr→Ala*:

MAKIAQGAM<u>A</u>RGSVHDFADFD<sup>1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR<sup>2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ<sup>3</sup>GTRENDDVV<sup>3</sup>SEDLVQQDVQDLYEA GELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR<sup>4</sup>S TPEYFAERLFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKA LLKLCGGDD<sup>1</sup>DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFNP<sup>5</sup>DADAKALRKA MKGIGTDEATIIDIITQRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDLMADLKSEISGDLARLILGLMM<sup>6</sup>PPAHYD AKQLKKAMEGAGTDEKALIEILATRTNAEIRAINEAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRILISLAT GNREEGGEN<sup>7</sup>RDQAQEDAQVAAEILEIADTPSGDKTSLETRFMTVLCTRSYPHLRRVFQEFIKK TNYDIEHVIKKEMSGDVKDAFVAIVQSVKN<sup>8</sup>KPLFFADKLYKSMKGAGTDEKTLTRVMVSRSE IDLLNIRREFIEKYDKSPHQAIEGDTSGDFMKALLALCGGED

## ∆*1-641*:

MAKIAQGAMYRGSVHDFADFD<sup>1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR<sup>2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ<sup>3</sup>GTRENDDVV<sup>3</sup>SEDLVQQDVQDLYEA GELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR<sup>4</sup>S TPEYFAERLFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKA LLKLCGGDD<sup>1</sup>DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFNP<sup>5</sup>DADAKALRKA MKGIGTDEATIIDIITQRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDLMADLKSEISGDLARLILGLMM<sup>6</sup>PPAHYD AKQLKKAMEGAGTDEKALIEILATRTNAEIRAINEAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRILISLAT GNREEGGEN<sup>7</sup>RDQAQEDAQVAAEILEIADTPSGDKTSLETRFMTVLCTRSYPHLRRVFQEFIKK TNYDIEHVIKKEMSGDVKDAFVAIVQSVKN<sup>8</sup>KPLFFADKLYKSMKGAGTDEKTLTRVMVSRSE IDLLNIRREF

# ∆ *1-500:*

MAKIAQGAMYRGSVHDFADFD<sup>|1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR<sup>|2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ<sup>|</sup>GTRENDDVV<sup>|3</sup>SEDLVQQDVQDLYEA GELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR<sup>|4</sup>S TPEYFAERLFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKA LLKLCGGDD<sup>|</sup>DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVELKGTVRAANDFNP<sup>|5</sup>DADAKALRKA MKGIGTDEATIIDIITQRSNAQRQQIRQTFKSHFGRDLMADLKSEISGDLARLILGLMM<sup>|6</sup>PPAHYD AKQLKKAMEGAGTDEKALIEILATRTNAEIRAINEAYKEDYHKSLEDALSSDTSGHFKRI

# ∆ *1-352:*

MAKIAQGAMYRGSVHDFADFD <sup>|</sup><sup>1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR <sup>|</sup><sup>2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ <sup>|</sup>GTRENDDVV <sup>|</sup><sup>3</sup>SEDLVQQDVQDLYEA GELKWGTDEAQFIYILGNRSKQHLRLVFDEYLKTTGKPIEASIRGELSGDFEKLMLAVVKCIR <sup>|</sup><sup>4</sup>S TPEYFAERLFKAMKGLGTRDNTLIRIMVSRSELDMLDIREIFRTKYEKSLYSMIKNDTSGEYKKA LLKLCGGDD <sup>|</sup>DAAGQFFPEAAQVAYQMWELSAVSRVE

## ∆ *1-175*:

MAKIAQGAMYRGSVHDFADFD | <sup>1</sup>ANQDAEALYTAMKGFGSDKESILELITSRSNKQRQEICQSY KSLYGKDLIADLKYELTGKFERLIVNLMR | <sup>2</sup>PLAYCDAKEIKDAISGIGTDEKCLIEILASRTNEQI HQLVAAYKDAYERDLESDIIGDTSGHFQKMLVVLLQ | GTRENDDVV | <sup>3</sup>SED

## Erläuterungen zu den Aminosäuresequenzen von Annexin VI und Mutanten:

Die N-terminale Domäne ist rot hervorgehoben. Die konservierten Kerndomänen sind voneinander getrennt und nummeriert. Kurze Schleifen zwischen den Domänen 2/3 bzw. 6/7 sind grün gefärbt. Die Verbindungshelix zwischen den Domänen 4 und 5 erscheint violett. Die Aminosäuren 370 und 396 (blau) differieren von der Sequenz aus Rattus Norvegicus (Fan et al., 1995). Zum besseren Verständnis werden nachfolgend die Symbole der Aminosäuren entschlüsselt:

А	Alanin	М	Methionin
В	Asparagin/Asparaginsäure	Ν	Asparagin
С	Cystein	Р	Prolin
D	Asparaginsäure	Q	Glutamin
Е	Glutaminsäure	R	Arginin
F	Phenylalanin	S	Serin
G	Glycin	Т	Threonin
Н	Histidin	V	Valin
Ι	Isoleucin	W	Tryptophan
Κ	Lysin	Y	Tyrosin
L	Leucin	Ζ	Glutamin/Glutaminsäure

# <u>9. ABKÜRZUNGEN</u>

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ВНК	baby hamster kidney cells; Nierenzellen des Hamsterbabys
CETP	Cholesterolester-Transfer-Protein
СНО	Chinese hamster ovary cells; Eierstockzellen des chinesischen Hamsters
CR	Chylomikronen Remnants
CURL	compartment of uncoupling receptors and ligands; Kompartiment der Dissoziation von Rezeptoren und Liganden
ECV	endosome carrier vesicle; endosomales Trägervesikel
EEA	early endosomal antigen; frühes endosomales Antigen
EGF	epidermal growth factor; epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAP	GTPase activating protein; GTPase aktivierendes Protein
GDF	GDI displacement factor; GDI-verdrängender Faktor
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor; Guanin-Nukleotid Austauschfaktor
GPI	Glycosilphosphatidylinositol
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	high density lipoproteins; Lipoproteine hoher Dichte
HL	Hepatische Lipase
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettich-Peroxidase
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
IDL	intermediate density lipoproteins; Lipoproteine mittlerer Dichte
IGF	insulin like growth factor; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
kD	kilo Dalton
LDL	low density lipoproteins; Lipoproteine geringer Dichte
LPL	Lipoproteinlipase

LRP	LDL-Rezeptor Related Protein; LDL-Rezeptor verwandtes Protein
МНС	major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
MVB	multivesicular bodies; multivesikuläre Körperchen
NRK	normal rat kidney fibroblasts; Fibroblasten der gewöhnlichen Rattenniere
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor; N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor
PDGF	platelet-derived growth factor; Plättchenwachstumsfaktor
RRC	receptor recycling compartment; Rezeptor rezyklierendes Kompartiment
SNAP	soluble NSF-attachment protein; lösliches, NSF-assoziiertes Protein
SNARE	SNAP receptor; SNAP-Rezeptor
SREBP	sterol regulatory element binding protein; Sterol-regulierendes Bindungsprotein
tPA	tissue plasminogen activator; Gewebeplasminogen-Aktivator
VLDL	very low density lipoproteins; Lipoproteine sehr geringer Dichte

## **10. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich besonders bei Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel und Herrn Privatdozent Dr. Thomas Grewal für die hervorragende und motivierende wissenschaftliche Betreuung sowie für die Überlassung des Themas dieser Arbeit bedanken. Desweiteren gebührt mein Dank Herrn Walter Tauscher, Herrn Prof. Dr. Stefan Jäckle, Herrn Dr. Jörg Heeren und Herrn Dr. Frank Apostel für ausgezeichnete technische Unterstützung, qualifizierte Ratschläge und anregende Kritik. Außerdem möchte ich meiner über alles geliebten Frau Pamela, meinem Sohn Joscha und meinen Eltern meinen herzlichsten Dank aussprechen, da deren Unterstützung, Verständnis und Ermutigungen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# **11. LEBENSLAUF**

#### **Persönliche Daten**

Name:	Tino Schnitgerhans
Geburtsdatum:	18.5.1975
Geburtsort:	Hamburg
Familienstand:	verheiratet mit Pamela
Kinder:	Sohn Joscha, geb. 24.12.2001
Eltern:	Jürgen Schnitgerhans und
	Ursula Schnitgerhans geb. Berkemeier
Schulbildung	
1981-1985	Grundschule Burgunderweg
1985-1994	Helene-Lange-Gymnasium (zweisprachiger Zweig)
1994	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
	in Hamburg
Berufsausbildung	
1994-1995	15 monatiger Zivildienst auf der Neurologie des AK Heidbergs
	(Hamburg)
1995-1999	freie journalistische Mitarbeit beim Norddeutschen Rundfunk
1996-2002	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2002-2004	Arzt im Praktikum im Klinikum Nord Ochsenzoll (Hamburg), Abteilung für Innere Medizin
Examina	
März 1998	Ärztliche Vorprüfung in Hamburg
März 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg
September 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg
November 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg

## Publikationen

Grewal T, Heeren J, Mewawala D, Schnitgerhans T, Wendt D, Salomon G, Enrich C, Beisiegel U, Jäckle S (2000) Annexin VI stimulates endocytosis and is involved in the trafficking of LDL to the prelysosomal compartment. J Biol Chem 275:33806-33813

Pons M, Grewal T, Rius E, Schnitgerhans T, Jäckle S, Enrich C (2001) Evidence for the involvement of Annexin 6 in the trafficking between the endocytic compartment and lysosomes. Exp Cell Res 269:13-22

# 12. ERKLÄRUNG

# **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tino Schnitgerhans